

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

|  |   |  |
|--|---|--|
| (51) 国際特許分類6<br>A61L 27/00   | A1  | (11) 国際公開番号<br>WO 96/10426   |
| (21) 国際出願番号<br>(22) 国際出願日<br>(30) 優先権データ<br>特願平6/261980 1994年9月30日 (30.09.94) JP   | PCT/JP95/01970<br>1995年9月28日 (28.09.95)   | (43) 国際公開日<br>1996年4月11日 (11.04.96)  |
| (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)<br>山之内製薬株式会社<br>(YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP]<br>〒103 東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号 Tokyo, (JP)   | (74) 代理人<br>弁理士 長井省三, 外(NAGAI, Shozo et al.)<br>〒174 東京都板橋区小豆沢1丁目1番8号<br>山之内製薬株式会社 特許情報部内 Tokyo, (JP) | (81) 指定国<br>AL, AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU,<br>IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN,<br>MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, TJ, TM, TT,<br>UA, US, UZ, VN, 歐州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB,<br>GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許(BF, BJ, CF, CG,<br>CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許(KE,<br>MW, SD, SZ, UG). |
| (72) 発明者: および<br>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)<br>横田祥士(YOKOTA, Shoji)[JP/JP]<br>〒425 静岡県焼津市中新田144番地16 Shizuoka, (JP)<br>下川誠太郎(SHIMOKAWA, Seitaro)[JP/JP]<br>〒426 静岡県藤枝市高柳1丁目12番19号 Shizuoka, (JP)<br>園原 律(SONOHARA, Ritsu)[JP/JP]<br>〒425 静岡県焼津市大住180番地1 Shizuoka, (JP)<br>岡田 昭(OKADA, Akira)[JP/JP]<br>〒426 静岡県藤枝市泉町12番地6 Shizuoka, (JP)<br>高橋浩一郎(TAKAHASHI, Koichiro)[JP/JP]<br>〒134 東京都江戸川区北葛西四丁目4番2号 Tokyo, (JP) | (添付公開書類)  | 国際調査報告書  |

(54) Title : OSTEOPLASTIC GRAFT

(54) 発明の名称 骨形成用移植体

(57) Abstract

An osteoplastic graft comprising a bone inducer supported on a composite porous body comprising a porous structure of a bioabsorbable hydrophilic material and a surface layer of a bioabsorbable polymeric material. Preferably, the hydrophilic material comprises at least one member selected from the group consisting of gelatin, hyaluronic acid and derivatives thereof, collagen and derivatives thereof, chitosan and derivatives thereof, and triethanolammonium alginate, while the polymeric material comprises at least one member selected from the group consisting of polylactic acid, poly(lactic acid-glycolic acid) copolymer, and poly[bis(p-carboxyphenoxy)propane] anhydride-sebacic acid copolymer. As the graft is excellent in moldability and operability and has an internal structure suitable for *in vivo* bone neogenesis, bone grafting occurs not only at the periphery of the graft but also within the graft.

AQ

(57) 要約

生体吸収性親水性材料からなる多孔性構造体の表面に生体吸収性高分子材料からなる表面層を有する複合多孔質体に、骨誘導因子を担持することを特徴とする骨形成用移植体。特に、生体吸収性親水性材料が、ゼラチン、ヒアルロン酸、ヒアルロン酸誘導体、コラーゲン、コラーゲン誘導体、キトサン、キトサン誘導体、及びアルギン酸トリエタノールアミンからなる群から選択される1種または2種以上の化合物であり、生体吸収性高分子材料がポリ乳酸、ポリ乳酸ポリグリコール酸共重合体、及びポリ[ビス(p-カルボキシフェノキシ)プロパン]無水物とセバシン酸との共重合体からなる群から選択される1種または2種以上の化合物である骨形成用移植体に関する。

本発明骨形成用移植体は、成形性・操作性に優れ、生体内での新生骨形成に適した内部構造を有するので、移植体の周辺部だけでなく中心部でも早期に骨形成が起きる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出版をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

|    |           |    |             |     |           |     |            |
|----|-----------|----|-------------|-----|-----------|-----|------------|
| AL | アルベニア     | DK | デンマーク       | LK  | スリランカ     | PT  | ポルトガル      |
| AM | アルメニア     | EE | エストニア       | LR  | リベリア      | RO  | ルーマニア      |
| AT | オーストリア    | ES | スペイン        | LS  | レソト       | RU  | ロシア連邦      |
| AU | オーストラリア   | FI | フィンランド      | LT  | リトアニア     | SD  | スークダム      |
| AZ | アゼルバイジャン  | FR | フランス        | LUV | ルクセンブルグ   | SG  | スウェーデン     |
| BB | バルバドス     | GA | ガボン         | LV  | ラトヴィア     | SI  | シンガポール     |
| BE | ベルギー      | GB | イギリス        | MC  | モナコ       | SK  | スロバキア      |
| BF | ブルガニア・ファソ | GE | グルジア        | MD  | モルドバ      | SNN | スロバキア共和国   |
| BG | ブルガリア     | GN | ギニア         | MG  | マダガスカル    | SZ  | セネガル       |
| BJ | ベナン       | GR | ギリシャ        | MK  | マケドニア旧ユーゴ | SWZ | スワジランド     |
| BR | ブラジル      | HU | ハンガリー       | SLV | スラヴェニア共和国 | TD  | チャード       |
| BY | ベラルーシ     | IE | アイルランド      | ML  | マリ        | TG  | トーゴ        |
| CA | カナダ       | IS | アイスランド      | MN  | モンゴル      | TJ  | タジキスタン     |
| CF | 中央アフリカ共和国 | IT | イタリー        | MR  | モーリタニア    | TM  | トルクメニスタン   |
| CG | コンゴー      | JP | 日本          | MW  | マラウイ      | TR  | トルコ        |
| CH | スイス       | KE | ケニア         | MX  | メキシコ      | TT  | トリニダード・トバゴ |
| CI | コート・ジボアール | KG | キルギスタン      | NE  | ニジニノヴゴロド  | UA  | ウクライナ      |
| CM | カメルーン     | KP | 朝鮮民主主義人民共和国 | NL  | オランダ      | UG  | ウガンダ       |
| CN | 中国        | KR | 大韓民国        | NO  | ノルウェー     | US  | 米国         |
| DE | デュッセ      | KZ | カザフスタン      | NZ  | ニュージーランド  | UZ  | ウズベキスタン共和国 |
|    | ドイツ       | LI | リヒテンシュタイン   | PL  | ポーランド     | VN  | ヴィエトナム     |

## 明細書

## 骨形成用移植体

## 技術分野

本発明は、骨誘導因子を含有する骨形成用移植体、及び骨誘導因子の担体として用いることのできる複合多孔質体に関する。

更に詳しくは、生体吸収性親水性材料からなる多孔性構造体の表面に生体吸収性高分子材料を付与してなる複合多孔質体に骨誘導因子を担持することを特徴とする骨形成用移植体、及び骨誘導因子の担体として有用な当該複合多孔質体に関する。

## 背景技術

骨誘導因子 (bone morphogenetic protein: BMP) は、皮下組織又は筋組織内の未分化間葉系細胞に作用して、これを軟骨芽細胞又は骨芽細胞に分化させ、軟骨又は骨を形成させる活性タンパク質である。BMPは、ウシ脱灰骨基質中に存在する異所性骨誘導活性を示す物質として発見されたが、純粋に単離されず、具体的な構造は未解明のままであった。しかし、遺伝子工学の技術により、ヒトBMPをコードする遺伝子がクローニングされ、アミノ酸配列が明らかになった。また、ヒトBMPは、アミノ酸配列が相同性を有する複数の近縁タンパク質からなる一群のファミリーを構成することも判明し、多数の種類の組換えヒト骨誘導因子 (rhBMP) が創製されてきた [Science Vol. 242, pp. 1528-1534 (1988); Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 87, pp. 2220-2224 (1990); Progress in Growth Factor Research, Vol. 1, pp. 267-280 (1989); 特表平2-500241号、特表平3-503649号、特表平3-505098号、WO 91/18098、

WO 92/05199、WO 93/09229の各公報]。また、形質転換体による生産も行われている。

前記のBMPを利用して、骨又は軟骨の損傷、欠損あるいは形成不全等の治療を行う方法は、そのBMPの構造が未解明であった頃から種々提案されており、組換えヒトBMPの生産に伴って更に盛んになっている。BMPを利用する際には、BMPを単独で局所に埋植して骨形成を誘導させることが極めて困難であるので、一般的には、BMPを担体に担持させた形で局所に埋植する。これは、BMPによる局所での骨誘導には数日ないし数週間が必要であり、少なくともその間にBMPを拡散させずにその局所に留めることが主要な目的である。このように、BMP用担体はBMPと共に生体内に埋植されるので、BMP活性を損なわずに、低毒性、低発癌性及び低抗原性等の特性を有することが要求され、更に入手容易性や、場合により生分解性を有することも望まれる。

既に提案されている技術としては、例えば、アテロコラーゲンからなる担体にBMPを担持させた移植体（特開昭62-89629号公報）、セラミック材料支持体にBMPとコラーゲン担体とを含浸させた移植体（特開昭60-253455号公報）や、rhBMPと多孔性生体分解性ポリマーと自家血とからなる組成物（米国特許第5,171,579号明細書）等がある。

しかし、BMPとコラーゲン担体のみからなる移植体では成形性が不十分で強度がなく、しかも生体での分解が速いので、生体内での形状維持も不十分で、骨形成が必ずしも充分ではなかった。また、成形性及び生体内部での形状維持を向上させるためにセラミック材料等の非分解性あるいは分解の遅い物質を支持体として又は担体に混合して用いた場合は、これらの物質が生体に吸収されずに残留し、均一な骨組織の形成を阻害する、あるいは残留担体が骨のリモデリング等による骨吸収の原因となる可能性を有する等の問題点があった。更に、多孔性生体分解性ポリマーと自家血とからなる組成物には、手術時の操作性や成形性の点で更に改善が望まれていた。

その上、コラーゲンや生体分解性ポリマーを用いた従来公知の移植体を生体内に移植した場合には、まず新生骨が移植体周囲に形成され、その後移植体の分解に伴って徐々に内部にも骨形成が進むことが知られている。例えば、不溶性骨基質やコラーゲン膜を担体とする移植体では、新生骨が移植体周囲から徐々に内部に形成されることが観察されたとする報告がある (THE BONE, 1993. 12, Vol. 7, No. 4, pp 97-104)。

また、特開平1-232967号公報には、相互に連結した空隙部を有するポリ乳酸 (PLA) の空隙部にヒアルロン酸のベロアが充填され、更にこれらにBMP等の活性物質を担持した移植骨片代用組成体が開示されている。但し、具体的な製造例、試験例の記載は無く、その骨形成能は不明である。当該技術は、構造を維持する骨格構造がPLAであり、その空隙部にヒアルロン酸ゲルが充填されたものである点において、本発明とは異なる。当該公報に記載された組成体の骨格構造をなす「相互に連結した空隙部を有するポリ乳酸」は、移植後少なくとも90日間に渡り残存し物理的な性質を維持することが記載されており、生体内に長期間残存するものであることが明らかである。また、当該公報記載の組成体はPLAスポンジを用いていることから、堅く脆い性状を有し、可塑性、弾性が低く、埋植時の成形性・操作性が不充分である。

更に、特開平3-23864号公報には生体組織用充填材として有用な、ポリ乳酸系を埋入したコラーゲンスポンジが、又、ドイツ特許第3,841,397号には、コラーゲンスポンジをポリエステルで被覆した徐放性医薬担体が開示されている。しかしながらこれらの担体にBMPを適用して骨形成用移植体として使用することは何等開示が無い。

従って、成形性や生体内での形状維持に優れ、手術時の操作性が優れおり、且つ、新生骨形成に優れたBMPを適用した骨形成用移植体が切望されていた。

#### 発明の開示

本発明者等は、成形性や生体内での形状維持が良好で手術時の操作性に優れ、且つ、新生骨形成に優れた、BMPを適用した骨形成用移植体の創製を目的として、銳意研究した結果、生体吸収性親水性材料からなる多孔性構造体の表面に生体吸収性高分子材料からなる表面層を有する複合多孔質体に、骨誘導因子を担持することを特徴とする骨形成用移植体が、前記目的を達成することを見出し本発明を完成した。

また、本発明は、ゼラチン、ヒアルロン酸、ヒアルロン酸誘導体からなる群から選択される1種又は2種以上の化合物からなる生体吸収性親水性材料からなる多孔性構造体の表面に、ポリ乳酸、ポリ乳酸ポリグリコール酸共重合体及びポリ〔ビス(p-カルボキシフェノキシ)プロパン〕無水物とセバシン酸との共重合体からなる群から選択される1種または2種以上の生体吸収性高分子材料を付与してなる複合多孔質体にも関する。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明による骨形成用移植体の代表的な実施態様における部分断面図を図1に模式的に示す。すなわち、本発明の骨形成用移植体1は、

- (1) 生体吸収性親水性材料からなる多孔性構造体2と、その表面に形成された生体吸収性高分子材料からなる表面層3とからなる複合多孔質体4と、
- (2) 前記複合多孔質体4の表面及び内部(すなわち、多孔性構造体2及び/又は表面層3内部、及び/又は孔内部)に分散して担持された骨誘導因子(BMP)5とからなる。また、骨形成用移植体1には多数の孔6が含まれる。これらの孔6は連続性を有し外部に開放されている。なお、図1に示す部分断面図は模式的なものであり、各構成部分の形状や大きさ等は図示した態様に何ら限定されるものではない。

本発明の移植体は、主に生体内で骨(軟骨を含む)を形成すべき部位に移植して使用する。本発明の移植体を生体内に移植すると、埋植した局所でBMPが作用して骨形成を誘発する。複合多孔質体は、このBMPを局所に留め、望ましい形態の骨を形成させるデリバリー・システムの役割を果たしながら、それ自体も徐々に生体内で吸収を受け、新生骨に置換される。

本発明で使用することのできる骨誘導因子（BMP）は、未分化の間葉系細胞に作用して、これを軟骨細胞や骨芽細胞へ分化させ、軟骨又は骨を形成させる活性を有するタンパク質であれば特に限定されず、その調製方法も限定されない。しかし、免疫性等の臨床上の安全性及び品質の安定した材料を大量に入手することができる点で遺伝子組換え技術により製造されたヒトBMPが好ましい。すなわち、ヒト骨誘導因子をコードする塩基配列を含む組換えDNAを含有する形質転換体（細胞又は微生物）を培養し、それら形質転換体によって産生された組換えヒト骨誘導因子を単離、精製して調製した組換えヒト骨誘導因子（rhBMP）である。これらのヒト骨誘導因子（rhBMP）としては、例えば、rhBMP-2、rhBMP-3、rhBMP-4（rhBMP-2Bともいう）、rhBMP-5、rhBMP-6、rhBMP-7、rhBMP-8、rhBMP-9、rhBMPのヘテロダイマー又はこれらの変体や一部欠損体を挙げることができる。これらのタンパク質を単独で又は2種以上の混合物として用いることができる。好ましくはrhBMP-2である。

これらのrhBMPは、哺乳動物細胞（例えば、CHO細胞）、微生物（例えば、大腸菌）又は酵母細胞等で発現したものであることができる。既に大量生産法及び精製法が確立しているrhBMPとしてはrhBMP-2があるが、その他のrhBMPを同様に製造し、精製して用いることができる〔*Progress in Growth Factor Research*, Vol. 1, pp. 267-280 (1989)〕。既に知られている精製rhBMP-2は、分子量約30,000の二量体タンパク質である。それぞれの単量体は、Asn<sup>56</sup>残基にハイ・マンノース型の糖鎖を有している〔*Abstract Sixth Interraction Symposium of the Protein Society, San Diego, CA (1992)*〕。

本発明による骨形成用移植体の支持体を構成する複合多孔質体は、前記のとおり多孔性構造体と表面層とからなる。多孔性構造体は、本発明移植体の

多孔質構造の基礎となる骨格を有する構造体である。この多孔性構造体の具体的構造は特に限定されず、その多孔性構造体を用いて製造した移植体が、例えば、スポンジ状、網目状又は纖維状等の任意の多孔質構造を構成するとのできる基礎構造を有していればよい。また、表面層は、前記の多孔性構造体の少なくとも一部の表面に付与された層であって、多孔性構造体と一体となって複合多孔質体を形成する。好ましい表面層は、多孔性構造体の多孔質構造に沿ってその全表面に一様に膜状に付与されるものである。更に、表面層自体がより微細な多孔質構造を有していることがより好ましい。

本発明による骨形成用移植体は、前記の多孔質構造を有するので、移植された後に、速やかに血液や生体内の細胞が多孔質体の孔内に入りこみ、骨形成に適した微小環境が移植体全体に（すなわち、移植体外部表面のみでなく移植体内部の孔内にも）形成されると共に、移植体表面及び／又は孔内に担持されたBMPが速やかに放出され、更にその後も多孔性構造体及び／又は表面層内に担持されたBMPが、それらの多孔性構造体及び／又は表面層の吸収に伴い徐々に放出される。従って、移植体表面のみばかりでなく、移植体内部の孔内、更には移植体の吸収された部分に骨が形成される。

本発明における生体吸収性親水性材料とは、生体親和性（すなわち、低毒性で、生体内での異物反応が低く、そして生体組織との親和性が良好であり）、生体吸収性（すなわち、生分解性があり）を有し、親水性であるが、水溶性が低いか又は水不溶性であり、しかも常温で固体状であって成形性を有する物質である。この様な性状を有する材料で有れば特に制限は無い。具体的には、ゼラチン、ヒアルロン酸、ヒアルロン酸誘導体〔例えば、ヒアルロン酸と、キトサン、ポリアミノガラクトサミン、アルギン酸トリエタノールアミン、ゼラチン、カゼイン、ケラチン、コラーゲン、ミオシン及び／又はフィブロイン等とのポリイオン複合体（例えば、特開平6-73103号公報参照）〕、コラーゲン、コラーゲン誘導体（例えば、サクシニル化コラーゲン、メチル化コラーゲン）、キトサン、キトサン誘導体（例えば、メチルピロリドンキトサン）、ポリアミノガラクトサミン、アルギン酸トリエタノールアミン等の生体吸収性親水性材料を用いて、多孔性構造体の表面層又は孔内に充てんする。

ミン、カゼイン、ケラチン、ミオシン、又はフィブロイン等を挙げることができる。好ましくは生体由来物質である、ゼラチン、ヒアルロン酸、ヒアルロン酸誘導体（特にゼラチン／ヒアルロン酸ポリイオン複合体）、コラーゲン、コラーゲン誘導体、キトサン、キトサン誘導体、又はアルギン酸トリエタノールアミン、より好ましくはゼラチン、ゼラチン／ヒアルロン酸ポリイオン複合体又はコラーゲンを用いる。前記の生体吸収性親水性材料を単独で又は2種以上を組み合わせて用いることができる。

生体吸収性親水性材料からなる多孔性構造体としては、従来公知の任意の多孔質体を用いることができる。例えば、ゼラチン多孔質体としては、ゼラチンを水に溶解し、泡立てた後に凍結乾燥してスポンジ状として調製した多孔質体を用いることが好ましい。特に、孔径約50～500μm、密度10～100mg/ml、及び気孔率90%以上のゼラチン多孔質体（例えば、スponzel（商品名：山之内製薬製））は、それ自体の重量の約30倍以上の水を吸収することができることから、止血剤として実際に用いられており、更に組織内で容易に吸収されるので体内に包埋してもよく、抗原性を有さない安全な材料であることが知られているので最も好ましい。

多孔性構造体として用いるコラーゲン多孔質体は、公知の方法でスポンジ状に成形された低抗原性のアテロコラーゲン由来の多孔質体（例えば、He listat（商品名：Marion Laboratories, Inc. 製））が好ましい。また、ヒアルロン酸誘導体の多孔質体としては、例えば、ゼラチン／ヒアルロン酸ポリイオン複合体からなるスponジ（特開平6-73103号公報）、ヒアルロン酸多孔質体としては、例えば、ヒアルロン酸を公知の手法により固化成形したヒアルロン酸多孔質体、キトサン誘導体多孔質体としては、例えば、Carbohydrate Polymers, 20, 99-106 (1993) に記載のキトサン誘導体からなる多孔質体をそれぞれ用いることができる。

多孔性構造体は、任意の形状（例えば、スponジ状、網目状、又は繊維状）であることができ、平均孔径が好ましくは10～1000μm、より好まし

くは50～500μmで、気孔率が好ましくは50%以上、より好ましくは70%以上、更に好ましくは90%以上の多孔質体である。

本発明の生体吸収性高分子材料とは、生体親和性（すなわち、低毒性で、生体内での異物反応が低く、そして生体組織との親和性が良好であり）、生体吸収性（すなわち、生分解性があり）を有し、しかも常温で固体状で成形性並びに一定の強度を有する高分子材料である。この様な性状を有するポリマーであれば特に制限は無い。具体的には、人工的に製造され、生体親和性及び生分解性を有し、更に生体吸収性を有する疎水性のポリマー、例えば、ポリ乳酸、ポリ乳酸ポリグリコール酸共重合体、ポリ〔ビス（p-カルボキシフェノキシ）プロパン〕無水物（P C P P）とセバシン酸の共重合体〔J. Neurosurg., 80: 283-290 (1994)〕、又はポリヒドロキシ酪酸（P H B）、ポリヒドロキシプロピオン酸（P H P）、ポリリソグ酸若しくはこれらの共重合体等を用いることができる。好ましくは、ポリ乳酸、ポリ乳酸ポリグリコール酸共重合体、又はポリ〔ビス（p-カルボキシフェノキシ）プロパン〕無水物（P C P P）とセバシン酸の共重合体である。平均分子量5000～1500000のポリ乳酸又は平均分子量5000～1500000でポリ乳酸/ポリグリコール酸の含有率（モル比）が40%以上であるポリ乳酸ポリグリコール酸共重合体を用いるのが特に好ましい。前記の生体吸収性高分子材料を単独で又は2種以上を組み合わせて用いることができる。

生体吸収性高分子材料からなる表面層を形成するには、生体吸収性高分子材料を適当な溶媒に溶解し、これを前記多孔性構造体の表面及び内部に任意の方法で添付・乾燥すればよい。例えば、ポリ乳酸（P L A）又はポリ乳酸ポリグリコール酸共重合体（P L G A）、特に平均分子量5000～150000のポリ乳酸又は平均分子量5000～1500000でポリ乳酸の含有率（モル比）が40%以上であるポリ乳酸ポリグリコール酸共重合体を0.2～20%（w/w）、好ましくは1～16%（w/w）の濃度で有機溶媒に溶解し、前記の生体吸収性高分子材料からなる層を多孔性構造体の表

面及び内部の各孔の表面にまで形成することができる任意の方法（例えば、噴霧又は塗布、好ましくは含浸）で、前記の溶液を多孔性構造体に付与し、更に乾燥（例えば、通風乾燥、好ましくは凍結乾燥）することによって行うことができる。生体吸収性高分子材料溶液を調製するための有機溶媒としては、例えば、ジオキサン、アセトン、酢酸エチル、ジメチルホルムアミド又は冰酢酸を用いることができる。

多孔性構造体と表面層とから前記の方法によって得られた複合多孔質体へのBMPの担持を良好にする等の目的で、所望により、他の添加剤、例えば、ゲル化剤、界面活性剤、安定化剤、及び／又はpH調整剤を適宜用いることができる。ゲル化剤としては、例えば、ヒアルロン酸、カルボキシメチルセルロース（ナトリウム）、ゼラチン、コラーゲン、ゲル状ポリ乳酸／ポリエチレングリコール共重合体、又は自家血液等を挙げることができ、これらの1種又はそれ以上を、BMP添加時又は、BMP添加の前に加えることができる。

また、界面活性剤も、多孔性構造体及び／又は表面層に添加することができ、好ましくは生体吸収性高分子材料からなる表面層に添加する。表面層に添加する場合には、生体吸収性高分子材料を付与する際に添加するか、あるいは生体吸収性高分子材料の付与後に添加（もしくは洗浄処理）を行うことができる。多孔性構造体に添加する場合は、構造体の調製時に添加するか、あるいは表面層の付与前に添加することができる。界面活性剤としては、好ましくは非イオン性界面活性剤、より好ましくはポリオキシエチレンソルビタンアルキルエステル類、例えば、ポリソルベート80やポリソルベート20等が好ましい。

生体吸収性高分子材料からなる表面層に界面活性剤（特に、ポリソルベート80）を添加すると、親水性が改善され、更に移植体に対する血液や細胞の吸収性・侵入性が向上するので好ましい。これらの場合には、界面活性剤0.01～10重量%、好ましくは0.05～2重量%を、表面層の表面に添加するか若しくは界面活性剤を含む溶液で洗浄処理をしてよい。

なお、安定化剤としては、例えば、グリシン等のアミノ酸類や糖類、pH調整剤としては、例えば、クエン酸等の製剤学的に許容される有機酸及び鉱酸を用いることができ、いずれも前記のゲル化剤や界面活性剤と同様の方法で添加することができる。

生体吸収性親水性材料からなる多孔性構造体の表面に生体吸収性高分子材料からなる表面層を有する複合多孔質体は、平均孔径が好ましくは10～1,000μm、より好ましくは40～600μmであり、気孔率が好ましくは40%以上、より好ましくは60%以上、更に好ましくは80%以上である。

当該複合多孔質体は、生体内において一定期間多孔質構造を維持し、細胞の進入を許し、骨形成の場を提供するものであり、且つ、徐々に分解吸収され完全に消失するものである。

本発明の複合多孔質体は、BMPを担持させる前に、必要に応じて滅菌処理を施しても良い。滅菌方法は医療上許容される方法であればいずれもよく、例えば、放射線滅菌、エチレンオキサイドガス滅菌や乾熱滅菌が挙げられる。

本発明の骨形成用移植体では、BMPが前記のとおり、複合多孔質体の少なくとも一部、すなわち、複合多孔質体の表面、複合多孔質体内部（言い換えるれば、多孔性構造体内部及び／又は表面層内部）及び／又は複合多孔質体の孔空間内に担持される。特に生体吸収性親水性材料はBMP水溶液の吸収性が良好であり、またBMPの吸着性も良好であるため、BMPの担持性に優れる。生体吸収性高分子材料は疎水性であるが、特に界面活性剤を含有するか又は界面活性剤で表面処理された場合にはBMPの吸収性及び吸着性が向上する。複合多孔質体の表面におけるBMPの担持性を高めるためにBMPの添加前あるいは添加と同時にゲル化剤等の基剤を付与してもよい。

本発明の複合多孔質体にBMPを担持させる方法も、BMPを好ましくは複合多孔質体全体に担持させることのできる方法であれば特に限定されるものではない。また、複合多孔質体の製造工程の任意の段階でBMPを加えることができる。例えば、多孔性構造体の製造工程の途中でBMPを添加する

か、多孔性構造体の完成時にその表面にBMPを添加するか、又は表面層付与時にBMPと一緒に添加することができる。また、ゲル化剤や界面活性剤等で複合多孔質体を処理する際にBMPを添加することもできる。

BMPの添加は、BMP溶液を含浸してそのまま移植体としてもよく、含浸体を凍結乾燥等で乾燥して用いてもよい。乾燥移植体を用いる場合は、使用時（移植時）に注射用水や生理食塩水で湿潤して使用するか、又は乾燥体のまま移植しても速やかに血液で湿潤するのでさしつかえない。

本発明による骨形成用移植体において、移植体1mL当たりの各構成成分の含有量は特に限定するものではないが、例えば、多孔性構造体を形成する生体吸収性親水性材料は、通常は500mg以下、好ましくは300mg以下、より好ましくは5～100mgであり、表面層を形成する生体吸収性高分子材料は、通常は500mg以下、好ましくは300mg以下、より好ましくは5～200mgであり、そしてBMPは、骨誘導作用を発現する濃度であればいずれでもよいが、rhBMP-2を用いる場合は、通常は0.01mg以上、好ましくは0.01～20mg、より好ましくは0.1～5.0mgである。

本発明による骨形成用移植体の好ましい態様の一例を示せば、以下のとおりである。すなわち、ゼラチン多孔質体からなる多孔性構造体と、ポリ乳酸ポリグリコール酸共重合体（PLGA）の表面層とからなる複合多孔質体に、BMP水溶液を含浸させると、BMP溶液の一部はPLGA表面層の微小孔を通過してPLGA内部に吸着し、更にその内部のゼラチン多孔質体基質に吸着する。必要により、凍結乾燥などによって乾燥する。こうして、複合多孔質全体にBMPを担持する本発明の骨形成用移植体を得ることができる。

こうして得られた本発明の骨形成用移植体を生体内に移植すると、移植体の表面からBMPが生体内に放出され、更に、PLGAの吸収やゼラチン多孔質体の吸収に伴い、内部のBMPも徐々に放出される。

本発明の移植体は、使用時にBMPを担持させ調製されてもよく、あるいはBMPを担持させた後使用時まで適切な条件下で保存されてもよい。本発

明の移植体は、各種の骨又は軟骨の欠損を修復するために、当該分野に知られた方法で、患部に移植することができる。すなわち、従来知られている移植体と同様に、生体に適用することができ、その目的、用途、適応部位、患者の状態等に応じて、当業者の常法に従って適宜適用することができる。

本発明の移植体は、形成される新生骨の形状を実質的に規定する。すなわち、その移植体の形状に対応して骨形成が生じる。従って、骨形成を期待する形状に沿って、本発明の移植体を成形することが望ましい。また、本発明の移植体は、移植手術後の取り出し手術の必要がない。

本発明による各種の骨形成用移植体は、それらを単独で用いるだけでなく、複数個あるいは複数種を任意に組み合わせて用いてもよい。また、本発明移植体と別の公知移植体とを組み合わせて用いてもよい。本発明移植体の局所への固定、形状の維持を目的として、あるいは強度が十分でない場合には、他の公知の補強材を併用することもできる。補強材は、例えば、移植体を固定するための生体適合性の膜、例えばコラーゲン膜やG T R法に用いるゴアテックス膜又はポリ乳酸膜等、あるいは本発明移植体と生体内組織（特に骨）との固定具、例えば金属プレート、骨結合用ピン又は固定釘等であり、これらの補強材は、必要があれば、骨形成後に、外科的に取り除くこともできる。また、他の公知の移植体と併用して用いてもよい。

また、本発明は、ゼラチン、ヒアルロン酸、ヒアルロン酸誘導体からなる群から選択される1種又は2種以上の化合物からなる生体吸収性親水性材料からなる多孔性構造体の表面に、ポリ乳酸、ポリ乳酸ポリグリコール酸共重合体及びポリ〔ビス（p-カルボキシフェノキシ）プロパン〕無水物とセバシン酸との共重合体からなる群から選択される1種または2種以上の生体吸収性高分子材料を付与してなる複合多孔質体にも関する。

生体吸収性親水性材料として、ゼラチン、及びゼラチン/ヒアルロン酸ポリイオン複合体、生体吸収性高分子材料として、平均分子量5000～150000のポリ乳酸、及び平均分子量5000～150000のポリ乳酸の含有率（モル比）が40%以上であるポリ乳酸ポリグリコール酸共重合体

からなる群から選択される1種または2種以上の化合物からなる複合体孔質体が好ましい。また、複合多孔質体の表面層に更に界面活性剤を添加したものがより好ましい。特に好ましくは、多孔性構造体が平均孔径50～500 $\mu\text{m}$ で気孔率90%以上のゼラチンスポンジでからなる複合体孔質体である。

### 産業上の利用可能性

本発明による骨形成用移植体では、多孔質基質及び表面層がそれぞれ生体吸収性親水性材料及び生体吸収性高分子材料から構成される。これらの各材料は、いずれもそれぞれ単独でBMPの担体となり得ることが従来から知られている。しかし、ゼラチンやコラーゲン等のような生体吸収性親水性材料は柔らかく変形しやすく、また生体内での分解性が速く1～2週間で分解吸収されてしまう。そのため、生体内で一定期間形状を維持する移植体を得ることができず、望ましい形状の骨を得ることが困難なケースもある。一方、生体吸収性高分子材料は疎水性であるため、BMPの担持性に劣る。また、生体親和性を有するが、その程度もコラーゲン等の生体親和性よりも弱い。更に、ある程度の堅さを有するが、可塑性が低く、脆くて成形性が不十分であるとともに、埋植後の湿润した状態においても脆く崩れやすい欠点があった。

これらの点より、多孔性に成形した生体吸収性高分子材料を生体親和性に優れるコラーゲン等で被覆することにより、生体親和性と強度を併せ持つ担体を得ることが容易に考えられる。しかし、実際には、この様な担体は可塑性に劣り、脆くて成形性、操作性が不充分であり、満足できるものではなかった。

本発明者等は、意外にも、生体親和性に劣る生体吸収性高分子材料をゼラチンスポンジ等の表面に被覆した複合多孔質体に、BMPを担持した本発明骨形成用移植体が、生体親和性、親水性が良好で、BMPの担持性にも優れることを見出した。しかも、本発明移植体は、高分子材料をコラーゲン等で被覆した場合とは異なり、弾性に富み手術時の操作性・適応性に優れるもの

であった。その上、本発明移植体は移植体の周辺部のみならず中心部においても早期に良好な骨形成が得られ、優れた骨形成能を有する事を見出した。

即ち、本発明骨形成用移植体は、以下のように従来のBMPを担持した移植体には無い、優れた特徴を示す。

本発明の骨形成用移植体は、適當な弾性を有する柔軟性のある担体であって、成形が容易であり、脆く崩れることなく、任意の形状に成形することができるばかりでなく、シート状に成形して巻きつけたり、特定形状の穴の中に詰め込むことも可能であり、骨欠損部の形状に容易にフィットし、操作性、適応性に優れるものである。

また、本発明の移植体は、適當な強度と弾性を有し、生体外での貯蔵中に長期間にわたり、また生体内に移植後の必要な期間にわたり、一定の形状を維持することができ、骨のできるスペースを確保し望ましい形状の骨を形成させることができある。また、親水性に優れ、移植体全体に体液（細胞や血液など）の浸透が良好であり、更に埋植後一定期間多孔質の形状が安定に保持されるので、骨細胞の成長に必要な安定な微小環境を提供することができる。BMPの吸着性が良好でありBMPの担持性に優れ、生体内でBMPを徐放化することができ、また、BMPが担体から漏れ出す事もないので、形成される骨が移植体の形状通りの形となる。更に、骨形成の進行と相まって一定期間後に、徐々に生体に吸収され、新生骨に置換されるため、移植体それ自体は長期間生体内に残存することなく、良好な骨組織が形成される。移植部位における刺激性も弱く、PLGA担体に見られる血液性シストの形成等も無い。

本発明移植体の生体内での吸収は、その大きさ、形状、適応部位、ポリマーの種類、濃度等によっても異なるが、おおよそ3～12週間で生体内で殆ど吸収される。

これらの性質より、本発明の移植体を用いれば、良好な新生骨の形成が可能となる。すなわち、後記試験例に示されるように本発明移植体による新生骨の形成は移植体周辺部のみならず、移植体中心部においても早期に生じる

ことが確認された。このことは、本発明移植体がその内部においても骨形成に適した良好な環境を有しているものであることを示唆するものである。

また、本発明の複合多孔質体は前記のように生体親和性、親水性が良好で、BMP等の活性物質の担持性にも優れ、しかも、適當な弾性を有する柔軟性のある担体であって、成形が容易であり、脆く崩れることなく、任意の形状に成形することができるばかりでなく、シート状に成形して巻きつけたり、特定形状の穴の中に詰め込むことも可能であり、骨等の組織の欠損部の形状に容易にフィットし、操作性、適応性に優れるものである。

本発明の複合多孔質体は、生体外での貯蔵中に長期間にわたり、また生体内に移植後の必要な期間にわたり、一定の形状及び強度を維持することができる。更に、一定期間後に、徐々に生体に吸収されそれ自体は長期間生体内に残存することは無い。移植部位における刺激性も弱く、生体材料として有用である。

従って、例えばポリペプチド等の活性物質の徐放化担体として、骨、軟骨等の生体組織の一時的な代用物として、又は骨、軟骨等の生体組織形成用移植体の担体として有用である。特にはBMPを担持した前記骨形成用移植体の担体として有用である。

以下の本発明の骨形成用移植体の優れた効果を証明するための試験及び結果を示す。

#### 移植試験例 1

##### (1) 試験方法

雄性ラット（5週齢：Long Evans）の左右の胸部皮下にエーテル麻酔下にて本発明移植体を移植し、異所性骨誘導活性を検討した（n = 6～8）。

本発明移植体としては、（A）実施例1にて、D,L-乳酸／グリコール酸共重合体2重量%含有溶液を吸収させたゼラチンスポンジを用いて調製した移植体〔以下、移植体（A）とする〕、（B）実施例1にて、D,L-乳

酸／グリコール酸共重合体4重量%含有溶液を吸収させたゼラチントンボンジを用いて調製した移植体〔以下、移植体（B）とする〕、及び（C）実施例2にて、D、L-乳酸／グリコール酸共重合体4重量%含有溶液を吸収させたゼラチントンボンジを用いて調製した移植体〔以下、移植体（C）とする〕であって、それぞれrhBMP-2を約20μg/100μl又は約80μg/100μl含有する移植体を用いた。また、対照として、前記の各移植体（A）、（B）及び（C）であって、rhBMP-2を含有しない移植体を調製して同様に移植した。組織摘出は移植から1週間、2週間、3週間及び4週間経過後に行った。摘出組織について、カルシウム含量測定（原子吸光法）、軟X線撮影、pQCT（末梢骨用定量コンピュータ連動断層撮影）、及び組織学的観察を行ない、骨形成の程度を評価した。

#### （2）カルシウム含量測定（原子吸光法）結果

摘出組織を2規定塩酸に2日以上浸漬させ、カルシウムを抽出しカルシウム含量を原子吸光法で測定した。

移植体のカルシウム含量の経時的变化を図2に示す。rhBMP-2を含有しない対照群（図2中で0μgで示される）では、いずれの移植体（A）、（B）及び（C）においても、ほとんどカルシウムは検出されなかったのに對し、rhBMP-2の20μg/100μl含有群（図2中で20μgで示される）及び80μg/100μl含有群（図2中で80μgで示される）では、いずれの移植体（A）、（B）及び（C）においても、カルシウム含量は移植から1週間経過以降、経時的に増加し、ほとんどの群で3週間もしくは4週間経過後に最大値を示した。また、その値はrhBMP-2の用量に依存して多くなっていた。なお、図2にてwkは移植後の経過時間（週）である。

#### （3）軟X線所見

抽出組織の軟X線所見によれば、rhBMP-2を含有しない対照群では、観察全週間において軟組織様の微弱なX線吸収のみが見られ、骨組織の形成は観察されなかった。この微弱なX線吸収は、移植体に起因すると考えられ、

経時的に縮小していることから、移植体が徐々に吸収されていることが、また、4週間経過後においてもそのX線吸収が観察されることから、4週間経過後においても移植体の一部が残存していることが示唆された。

一方、rhBMP-2を20μg/100μl含有する群では、移植から1週間経過後より、誘導された骨組織によるX線吸収像が観察され、これは移植から2週間経過後以降に、より顕著となった。移植から3週間経過後における軟X線写真を図3(rhBMP-2を20μg/100μl含有する移植体(A))、図4(rhBMP-2を20μg/100μl含有する移植体(B))、及び図5(rhBMP-2を20μg/100μl含有する移植体(C))に示す。

これらの軟X線像より、ほぼ移植体の形状に沿って骨組織が形成していることが示唆された。

#### (4) pQCT(末梢骨用定量CT)によるカルシウム分布検索結果

pQCTを用いて摘出組織のカルシウム分布の検索を行った。摘出組織の垂直方向断面のカルシウム分布の検索結果によれば、移植体の表層部のみならず、移植体の内部においてもまだらなカルシウムの分布が観察され、移植体の孔部分に沿った骨組織の形成が示唆された。

#### (5) 組織学的観察結果

摘出組織をギ酸-クエン酸により脱灰操作した後、パラフィン包埋して薄切切片を作製し、ヘマトキシリン&エオジン(HE)染色を施し、光学顕微鏡下で観察した。移植から3週間経過後における移植体(C)(rhBMP-2を20μg/100μl含有する群)の組織像を図6~8に示す。図6は、摘出組織中央部を垂直方向に切断した断片の組織像(80倍)であり、図7は、水平方向に切断した断片の組織像(66倍)である。それらのいずれにおいても移植体全体にHEにより赤く染色された骨組織(図6及び図7の黒い部分)が観察され、移植体の孔に沿って移植体内部にまで骨組織が形成されていた。図8は、図7を更に拡大した図である(330倍)。この拡大図では、骨基質間隙に毛細血管、骨髄細胞、脂肪組織からなる骨髄組織も

観察された。また、移植体の残存を経時的に観察した結果、移植から1週間経過後では、多孔質状の移植体がほぼ残存していたが、一部のゼラチンが吸収されはじめている像が見られた。移植から2週間経過後においては、更にゼラチン部分の吸収が進んでいる像が認められ、移植から3週間経過後ではゼラチン部分のほとんどが吸収されていた。

一方、PLGAは薄い層として移植体内部に残存し、4週間経過後においても残存を示す大小の孔を内張りする無色透明の薄い層の像が観察された。

更に、本発明移植体の周囲組織には出血、壊死、浮腫等の変化は観察されず、本移植体は局所刺激性が弱いことが示された。

#### (6) 考察

以上の結果より、本発明移植体はラット異所性骨誘導のモデルにおいて、rhBMP-2による骨誘導を移植から3週間経過後もしくはそれ以降に最大とし、更に、移植体内部においても良好な骨組織を誘導することができる、優れた骨誘導能を有するものであることが確認された。本発明移植体は生体内で徐々に吸収されて縮小し、その局所刺激性も低いものであることも認められた。

### 移植試験例 2

#### (1) 試験方法

前記移植試験例1と同様にして、本発明移植体として実施例23で製造した多孔性移植体であって、rhBMP-2を0.1mg/ml又は0.4mg/ml含有する移植体を用いて試験を行った。対照として、同様にrhBMP-2を0.1mg/ml又は0.4mg/ml含有する以下の移植体を調製して移植した。

比較移植体A：米国特許第5,171,579号明細書に記載された方法で調整した、PLGAの多孔性マイクロスフェア（平均粒子径約250μm, 平均細孔径約30μm）をrhBMP-2溶液と血液を1:9に混和した溶液に添加し固化させペースト状とした移植体。

比較移植体B：PLGA（モル比=50:50、分子量=40,000：ベーリンガーインゲルハイム社製）を16重量%含有するジオキサンに塩化ナトリウム顆粒を添加し凍結乾燥後、水で洗浄し塩化ナトリウムを溶解除去し乾燥して製造したPLGAスponジ（孔径100～500μm、気孔率90%）に、rhBMP-2溶液と血液を1:9に混和した溶液を滴下吸収させた移植体。

尚、BMP未添加の本発明移植体、即ち複合多孔質体の電子顕微鏡写真を図9に、同じくBMP未添加の比較移植体A及びBに用いた担体の電子顕微鏡写真を図10及び図11に示す。

組織摘出は移植から1週間、2週間、3週間及び4週間経過後に行つた。摘出組織について、湿重量を測定後、カルシウム含量測定（原子吸光法）、及び組織学的観察を行ない、骨形成の程度を評価した。

## （2）結果

電子顕微鏡による担体の比較より、本発明移植体に用いる複合多孔質体は比較担体とは異なり、連続性を有する多くの気孔を有し、体液や細胞の進入を受けやすい構造であることがわかる。

移植試験の結果、比較移植体Aは骨形成は良好であったが、中央部に血液性シストの形成及び膨化が観察され、また、比較移植体Bでは埋入時強度が不足し脆く操作性に劣り、また埋植後も強度不足から担体が分裂し血液性シストの形成および膨化が認められた。これに対し、本発明移植体は柔軟性を有し、埋入時の操作性も良好であった。また、埋植後は移植体の形状とほぼ同一の形及び大きさの骨組織が誘導され、膨化や血液性シストの形成も殆ど認められなかった。また、摘出組織のカルシウム含量／湿重量比は他の担体に比べて最も高かった。

## 移植試験例 3

### （1）試験方法

骨欠損部における骨形成能を評価するため、麻酔下において日本白色種ウ

サギ（16～20週齢、雄性）の右尺骨に1.5 cm長の全層欠損を作製し、欠損部に本発明移植体として実施例3にてゼラチンスポンジにD, L-乳酸／グリコール酸共重合体4重量%含有溶液を吸収させた複合多孔質体にrhBMP-2を約0.1 mg/ml又は0.4 mg/ml含有する移植体を埋入した。術後単純X線撮影に及びpQCTによる欠損部のCT撮影を経時に実施しカルシウムの分布を観察した。12週経過後に屠殺し、ホルマリン固定及び脱灰後パラフィン切片を作成し、組織学的に検討した。

## （2）結果

本発明移植体は変形に対する復元性に優れ、骨欠損部に容易に埋入でき、操作性に優れていた。また、術後2週においてX線不透過像が認められ、3～4週になると断層間の癒合が認められた。pQCTによる観察においては術後3～6週までに担体の内部方向へと骨形成が進行し、その後再び中心部の骨が吸収される像が認められた。これはリモデリングに伴う皮質骨ならびに骨髓腔の形成を示唆する所見と考えられ、組織所見においてもこの様な構造を有する骨が形成されることが確認された。また、癒合速度ならびに骨形成量には用量依存性がみられた。

## 4. 移植体の単位体積当たりのBMP吸着量、ならびに吸着率

### （1）試験方法

10×10×5 mmに成形した各種担体（実施例3にてゼラチンスポンジにD, L-乳酸／グリコール酸共重合体4重量%含有溶液を吸収させた複合多孔質体、PLAスポンジ（商品名「DRILAC CUBE」；THM BIOMEDICAL INC. 製）、ならびにゼラチンスポンジ（商品名「スポンゼル」；山之内製薬（株）製））に濃度0.4 mg/mlの<sup>125</sup>I-rhBMP-2溶液をそれ以上吸収出来なくなるまで滴下・湿潤させ、60分間室温で放置する。次にrhBMP-2を含む各種担体を150 μmのステンレスメッシュを底面に備えた5 mlのシリンジに入れ、更にこのシリンジを14 mlのポリプロピレン製遠心

チューブに挿入後、2500RPM、20分間（ゼラチンスポンジは2000RPM、10分間）室温で遠心し、担体の放射活性を測定し、当初に添加した放射活性との比を求めた。

## （2）結果

同一体積当たりのBMP吸着量は、本発明移植体が最も多く、PLAスポンジ及びゼラチンスポンジの約1.5倍の量を吸着していた。また、総添加量に対する吸着率も約70%であり、PLAスポンジの50%、及びゼラチンスポンジの60%より優れるものであった。

以上の様に、本発明移植体は、生体内で速やかに骨形成を誘導し、しかも移植体全体が新生骨に徐々に置換し、移植体の残存を完全に無くし、良好な骨組織を形成することができ、しかも適応時の操作性及び成形性にも優れている。従って、外傷、疾病又は先天性の欠陥等によって引き起こされた各種の骨又は軟骨の欠損を修復するために、当該分野に知られた方法で患部に適用することができる。本発明移植体は生体内に移植された際に、起炎性が低く生体適合性に優れており、自然に近い状態で骨又は軟骨の修復が可能になる。

本発明移植体は、各種の分野に適用することができ、例えば、骨折等の外傷、腫瘍あるいは炎症性、変性ないし壞死性骨疾患等の疾患、脳外科あるいは整形外科手術等の手術に伴う採骨等による骨又は軟骨の欠損部位の修復、各種骨折の治癒促進、人工関節、人工骨若しくは人工歯根等の人工インプラント周囲での骨の形成、人工インプラント使用時の固着促進、脊椎固定促進、脚延長等の整形外科分野における骨の補填、軟骨の再生、関節の再建、形成外科分野での骨又は軟骨の補填、あるいは歯科領域での骨、軟骨又はセメント質の修復やインプラント使用のための骨の増大等に好適である。

### 図面の簡単な説明

図1は、本発明移植体の代表的な実施態様の部分断面構造を模式的に示す説明図である。

### 符号の説明

1・・移植体；2・・多孔性構造体；3・・表面層；4・・複合多孔質体；  
5・・BMP；6・・孔

図2は、本発明移植体を移植した場合のカルシウム含量の経時的変化を示すグラフである。

図3は、r h BMP-2 (20  $\mu$ g / 100  $\mu$ l) を含有する本発明移植体(A)の、移植から3週間経過後における軟X線写真である。

図4は、r h BMP-2 (20  $\mu$ g / 100  $\mu$ l) を含有する本発明移植体(B)の、移植から3週間経過後における軟X線写真である。

図5は、r h BMP-2 (20  $\mu$ g / 100  $\mu$ l) を含有する本発明移植体(C)の、移植から3週間経過後における軟X線写真である。

図6は、移植から3週間経過後における本発明移植体(C) (r h BMP-2を20  $\mu$ g / 100  $\mu$ l 含有) の垂直方向に切断した摘出組織の組織像(80倍)の断面図である。

図7は、移植から3週間経過後における本発明移植体(C) (r h BMP-2を20  $\mu$ g / 100  $\mu$ l 含有) の水平方向に切断した摘出組織の組織像(66倍)の断面図である。

図8は、図7の部分拡大図(330倍)である。

図9は、本発明複合多孔質体の電子顕微鏡写真(35倍)である。

図10は、比較移植体Aに用いた担体の電子顕微鏡写真(50倍)である。

図11は、比較移植体Bに用いた担体の電子顕微鏡写真(35倍)である。

## 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

### 実施例 1

D, L-乳酸とグリコール酸との共重合体（モル比 = 50 : 50, 分子量 = 40,000 : ベーリンガーインゲルハイム社製）2.0 g 又は 4.0 g を、予めポリソルベート 80 [関東化学（株）製試薬] を 0.1 重量% となるように加えた 1,4-ジオキサン [関東化学（株）製試薬] に加えて加熱溶解し 100 ml とした。このポリマー溶液を室温まで冷却後、7 cm × 10 cm × 1 cm の止血用ゼラチンスponジ [商品名「スponゼル」；山之内製薬（株）製] にポリマー溶液を吸収できなくなるまで滴下して湿潤させた（約 70 ml）。次にこのポリマー溶液を吸収したゼラチンスponジを -30 °C で凍結後、0.1 mbar で乾燥し複合多孔質体を得た。次に、これを 7 mm × 7 mm × 4 mm に切断後、r h BMP-2 [Genetics Institute 製（以下の実施例でも使用）] [2 mg/ml ~ 8 mg/ml; 2.5% グリシン, 0.5% 白糖, 5 mM 塩化ナトリウム, 5 mM グルタミン酸, 0.01% ポリソルベート 80; pH 4.5] 溶液と血液を 1 : 9 に混和した溶液約 200 μl を滴下して吸収させ、r h BMP-2 (20 μg/100 μl ~ 80 μg/100 μl) を含有する本発明の多孔性骨移植体を得た。

### 実施例 2

D, L-乳酸とグリコール酸との共重合体（モル比 = 50 : 50, 分子量 = 40,000 : ベーリンガーインゲルハイム社製）2.0 g 又は 4.0 g を、予めポリソルベート 80 を 0.1 重量% となるように加えた 1,4-ジオキサン [関東化学（株）製試薬] に加えて加熱溶解し 100 ml とした。このポリマー溶液を室温まで冷却後、7 cm × 10 cm × 1 cm のゼラチンスponジ（スponゼル）にポリマー溶液を吸収できなくなるまで滴下して湿

潤させた（約70ml）。次にこのポリマー溶液を吸収したゼラチンスポンジを-30℃で凍結後、0.1mbarで乾燥し複合多孔質体を得た。次にこれに鶏冠由来ヒアルロン酸ナトリウム〔和光純薬（株）製〕を0.25重量%とした溶液を滴下して湿潤させた後、公知の方法で凍結乾燥した。更に7mm×7mm×4mmに切断後、rhBMP-2（2mg/ml～8mg/ml；2.5%グリシン、0.5%白糖、5mM塩化ナトリウム、5mMグルタミン酸、0.01%ポリソルベート80；pH4.5）溶液と血液を1:9に混和した溶液約200μlを滴下して吸収させ、rhBMP-2（20μg/100μl～80μg/100μl）を含有する本発明の多孔性骨移植体を得た。

### 実施例3

D. L-乳酸とグリコール酸との共重合体（モル比=50:50、分子量=40,000：ベーリンガーインゲルハイム社製）2.0g又は4.0gを、予めポリソルベート80を0.1重量%となるように加えた1,4-ジオキサン〔関東化学（株）製試薬〕に加えて加熱溶解し100mlとした。このポリマー溶液を室温まで冷却後、7cm×10cm×1cmのゼラチンスポンジ（ポンゼル）にポリマー溶液を吸収できなくなるまで滴下して湿潤させた（約70ml）。次にこのポリマー溶液を吸収したゼラチンスポンジを-30℃で凍結後、0.1mbarで乾燥し複合多孔質体を得た。次に、rhBMP-2（0.1mg/ml～0.8mg/ml；2.5%グリシン、0.5%白糖、5mM塩化ナトリウム、5mMグルタミン酸、0.01%ポリソルベート80；pH4.5）溶液約70mlを滴下して吸収させ、本発明の多孔性骨移植体を得た。

### 実施例4

D. L-乳酸とグリコール酸との共重合体（モル比=50:50、分子量=40,000：ベーリンガーインゲルハイム社製）2.0g又は4.0g

を、予めポリソルベート 80 を 0.1 重量% となるように加えた 1,4-ジオキサン〔関東化学(株) 製試薬〕に加えて加熱溶解し 100 ml とした。このポリマー溶液を室温まで冷却後、7 cm × 10 cm × 1 cm のゼラチンスポンジ(スポンゼル)にポリマー溶液を吸収できなくなるまで滴下して湿潤させた(約 70 ml)。次にこのポリマー溶液を吸収したゼラチンスポンジを -30 °C で凍結後、0.1 mbar で乾燥し複合多孔質体を得た。更にこれに r h BMP-2 [0.1 mg/ml ~ 0.8 mg/ml; 2.5% グリシン, 0.5% 白糖, 5 mM 塩化ナトリウム, 5 mM グルタミン酸, 0.01% ポリソルベート 80; pH 4.5] 溶液約 70 ml を滴下して吸収させた後、公知の方法で凍結乾燥し、本発明の多孔性骨移植体を得た。

#### 実施例 5

D. L-乳酸とグリコール酸との共重合体(モル比 = 50 : 50, 分子量 = 40,000:ベーリンガーインゲルハイム社製) 2.0 g 又は 4.0 g を、予めポリソルベート 80 を 0.1 重量% となるように加えた 1,4-ジオキサン〔関東化学(株) 製試薬〕に加えて加熱溶解し 100 ml とした。このポリマー溶液を室温まで冷却後、7 cm × 10 cm × 1 cm のゼラチンスポンジ(スポンゼル)にポリマー溶液を吸収できなくなるまで滴下して湿潤させた(約 70 ml)。次にこのポリマー溶液を吸収したゼラチンスポンジを -30 °C で凍結後、0.1 mbar で乾燥し複合多孔質体を得た。次に、これに、ゼラチン(バイオラッド(株) 製試薬)を 0.2 重量% とした水溶液を滴下して湿潤させた後、公知の方法で凍結乾燥し、r h BMP-2 [0.1 mg/ml ~ 0.8 mg/ml; 2.5% グリシン, 0.5% 白糖, 5 mM 塩化ナトリウム, 5 mM グルタミン酸, 0.01% ポリソルベート 80; pH 4.5] 溶液約 70 ml を滴下して吸収させ、本発明の多孔性骨移植体を得た。

#### 実施例 6

D, L-乳酸とグリコール酸との共重合体（モル比=50:50, 分子量=40,000:ベーリンガーインゲルハイム社製）2.0g又は4.0gを、予めポリソルベート80を0.1重量%となるように加えた1,4-ジオキサン〔関東化学（株）製試薬〕に加えて加熱溶解し100mlとした。このポリマー溶液を室温まで冷却後、7cm×10cm×1cmのゼラチンスポンジ（スポンゼル）にポリマー溶液を吸収できなくなるまで滴下して湿潤させた（約70ml）。次にこのポリマー溶液を吸収したゼラチンスポンジを-30℃で凍結後、0.1mbarで乾燥し複合多孔質体を得た。次にこれに、ゼラチン〔バイオラッド（株）製試薬〕を0.2重量%含むr h B MP-2〔0.1mg/ml～0.8mg/ml; 2.5%グリシン, 0.5%白糖, 5mM塩化ナトリウム, 5mMグルタミン酸, 0.01%ポリソルベート80; pH 4.5〕溶液約70mlを滴下して吸収させ、公知の方法で凍結乾燥し、本発明の多孔性骨移植体を得た。

#### 実施例7

D, L-乳酸とグリコール酸との共重合体（モル比=50:50, 分子量=40,000:ベーリンガーインゲルハイム社製）2.0g又は4.0gを、予めポリソルベート80を0.1重量%となるように加えた1,4-ジオキサン〔関東化学（株）製試薬〕に加えて加熱溶解し100mlとした。このポリマー溶液を室温まで冷却後、7cm×10cm×1cmのゼラチンスポンジ（スポンゼル）にポリマー溶液を吸収できなくなるまで滴下して湿潤させた（約70ml）。次にこのポリマー溶液を吸収したゼラチンスポンジを-30℃で凍結後、0.1mbarで乾燥し複合多孔質体を得た。次にこれに、鶏冠由来ヒアルロン酸ナトリウム〔和光純薬（株）製〕を0.2重量%含むr h B MP-2〔0.1mg/ml～0.8mg/ml; 2.5%グリシン, 0.5%白糖, 5mM塩化ナトリウム, 5mMグルタミン酸, 0.01%ポリソルベート80; pH 4.5〕溶液約70mlを滴下して吸収させ、公知の方法で凍結乾燥し、本発明の多孔性骨移植体を得た。

### 実施例 8

D, L-乳酸とグリコール酸との共重合体（モル比=50:50, 分子量=40,000:ベーリンガーインゲルハイム社製）2.0g又は4.0gを、予めポリソルベート80を0.1重量%となるように加えた1,4-ジオキサン〔関東化学（株）製試薬〕に加えて加熱溶解し100mlとした。このポリマー溶液を室温まで冷却後、7cm×10cm×1cmのゼラチンスポンジ（ポンゼル）にポリマー溶液を吸収できなくなるまで滴下して湿潤させた（約70ml）。次にこのポリマー溶液を吸収したゼラチンスポンジを-30℃で凍結後、0.1mbaで乾燥し複合多孔質体を得た。次にこれに、鶏冠由来ヒアルロン酸ナトリウム〔和光純薬（株）製〕を0.2重量%とした水溶液を滴下して湿潤させた後、公知の方法で凍結乾燥し、r h BMP-2〔0.1mg/ml～0.8mg/ml; 2.5%グリシン, 0.5%白糖, 5mM塩化ナトリウム, 5mMグルタミン酸, 0.01%ポリソルベート80; pH 4.5〕溶液約70mlを滴下して吸収させ、本発明の多孔性骨移植体を得た。

### 実施例 9

D, L-乳酸とグリコール酸との共重合体（モル比=50:50, 分子量=40,000:ベーリンガーインゲルハイム社製）2.0g又は4.0gを、予めポリソルベート80を0.1重量%となるように加えた冰酢酸〔関東化学（株）製試薬〕に加えて溶解し100mlとした。このポリマー溶液を室温まで冷却後、7cm×10cm×1cmのゼラチンスポンジ（ポンゼル）にポリマー溶液を吸収できなくなるまで滴下して湿潤させた（約70ml）。次にこのポリマー溶液を吸収したゼラチンスポンジを-30℃で凍結後、0.1mbaで乾燥した。この凍結乾燥体を、冷却した水200mlに2回浸漬して冰酢酸を抽出後、凍結乾燥し、7mm×7mm×4mmに切断し、r h BMP-2〔0.1mg/ml～0.8mg/ml; 2.5%

グリシン, 0. 5%白糖, 5 mM塩化ナトリウム, 5 mMグルタミン酸, 0. 01%ポリソルベート80; pH 4. 5] 溶液約200 μlを滴下して吸収させ、本発明の多孔性骨移植体を得た。

### 実施例10

7 cm × 10 cm × 1 cmのゼラチンスポンジ（スポンゼル）にr h BMP-2 [0. 1 mg/ml ~ 0. 8 mg/ml; 2. 5%グリシン, 0. 5%白糖, 5 mM塩化ナトリウム, 5 mMグルタミン酸, 0. 01%ポリソルベート80; pH 4. 5] 溶液約70 mlを滴下して吸収させ、公知の方法により凍結乾燥してr h BMP-2/ゼラチンスポンジを得た後、D, L-乳酸とグリコール酸との共重合体（モル比=75:25, 分子量=50, 000:ベーリンガーインゲルハイム社製）2. 0 gを、予めポリソルベート80を0. 1重量%となるように加えた1, 4-ジオキサン〔関東化学（株）製試薬〕に加えて加熱溶解して100 mlとした溶液を室温まで冷却後、溶液を吸収できなくなるまで滴下して湿潤させた（約70 ml）。次にこのポリマー溶液を吸収したr h BMP-2/ゼラチンスポンジを-30℃で凍結後、0. 1 mbarで乾燥し、本発明の多孔性骨移植体を得た。

### 実施例11

D, L-乳酸とグリコール酸との共重合体（モル比=50:50, 分子量=40, 000:ベーリンガーインゲルハイム社製）2. 0 g又は4. 0 gを、予めポリソルベート80を0. 1重量%となるように加えた1, 4-ジオキサン〔関東化学（株）製試薬〕に加えて溶解し100 mlとした。このポリマー溶液を室温まで冷却した。別に、公知の方法で調製したr h BMP-2 [0. 1 mg/ml ~ 0. 8 mg/ml; 2. 5%グリシン, 0. 5%白糖, 5 mM塩化ナトリウム, 5 mMグルタミン酸, 0. 01%ポリソルベート80; pH 4. 5] 溶液の凍結乾燥粉末を、r h BMP-2として20 mg ~ 80 mgの量でポリマー溶液に添加して攪拌し、r h BMP-2懸濁

液を調製した。この r h B M P - 2 懸濁液を 7 c m × 1 0 c m × 1 c m のゼラチンスponジ（スponゼル）に懸濁液が吸収できなくなるまで滴下して湿潤させた（約 7 0 m l）。次にこのポリマー溶液を吸収したゼラチンスponジを - 3 0 ℃ で凍結後、0. 1 m b a r で乾燥し、本発明の多孔性骨移植体を得た。

### 実施例 1 2

7 c m × 1 0 c m × 1 c m のゼラチンスponジ（スponゼル）に r h B M P - 2 [0. 1 m g / m l ~ 0. 8 m g / m l ; 2. 5 % グリシン、0. 5 % 白糖、5 mM 塩化ナトリウム、5 mM グルタミン酸、0. 0 1 % ポリソルベート 8 0 ; pH 4. 5] 溶液約 7 0 m l を滴下して吸収させ、公知の方法により凍結乾燥して r h B M P - 2 / ゼラチンスponジを得た後、D, L-乳酸とグリコール酸との共重合体（モル比 = 7 5 : 2 5、分子量 = 5 0, 0 0 0 : ベーリンガーインゲルハイム社製）2. 0 g を、予めポリソルベート 8 0 を 0. 1 重量 % となるように加えた 1, 4-ジオキサン〔関東化学（株）製試薬〕に加えて加熱溶解して 1 0 0 m l とした溶液を室温まで冷却後、溶液を吸収できなくなるまで滴下して湿潤させた（約 7 0 m l）。次にこのポリマー溶液を吸収した r h B M P - 2 / ゼラチンスponジを - 3 0 ℃ で凍結後、0. 1 m b a r で乾燥した。r h B M P - 2 [0. 1 m g / m l ~ 0. 8 m g / m l ; 2. 5 % グリシン、0. 5 % 白糖、5 mM 塩化ナトリウム、5 mM グルタミン酸、0. 0 1 % ポリソルベート 8 0 ; pH 4. 5] 溶液約 7 0 m l を滴下／吸収させ、公知の方法で凍結乾燥し、r h B M P - 2 (0. 2 m g / m l ~ 1. 6 m g / m l) を含有する本発明の多孔性骨移植体を得た。

### 実施例 1 3

ポリ D, L-乳酸〔分子量 = 5 0, 0 0 0 ; 三井東圧化学（株）製〕1. 0 g を、予めポリソルベート 8 0 を 0. 1 重量 % となるように加えた 1, 4

ージオキサン〔関東化学(株)製試薬〕に加えて溶解し100mlとした。このポリマー溶液を室温まで冷却後、7cm×10cm×1cmのゼラチンスポンジ(スポンゼル)にポリマー溶液を吸収できなくなるまで滴下して湿潤させた(約70ml)。次にこのポリマー溶液を吸収したゼラチンスポンジを-30℃で凍結後、0.1mbarrで乾燥し複合多孔質体を得た。更にrhBMP-2(0.1mg/ml～0.8mg/ml; 2.5%グリシン, 0.5%白糖, 5mM塩化ナトリウム, 5mMグルタミン酸, 0.01%ポリソルベート80; pH4.5)溶液約70mlを滴下して吸収させ、公知の方法で凍結乾燥し、本発明の多孔性骨移植体を得た。

#### 実施例14

ポリD,L-乳酸(分子量50,000;三井東圧化学(株)製)1.0gを、予めポリソルベート80を1.0重量%となるように加えた1,4-ジオキサン〔関東化学(株)製試薬〕に加えて溶解し100mlとした。このポリマー溶液を室温まで冷却後、7cm×10cm×1cmのゼラチンスポンジ(スポンゼル)にポリマー溶液を吸収できなくなるまで滴下して湿潤させた(約70ml)。次にこのポリマー溶液を吸収したゼラチンスポンジを-30℃で凍結後、0.1mbarrで乾燥し複合多孔質体を得た。更にrhBMP-2(0.1mg/ml～0.8mg/ml; 2.5%グリシン, 0.5%白糖, 5mM塩化ナトリウム, 5mMグルタミン酸, 0.01%ポリソルベート80; pH4.5)溶液約70mlを滴下して吸収させ、公知の方法で凍結乾燥し、本発明の多孔性骨移植体を得た。

#### 実施例15

ポリL-乳酸(分子量=60,000:ベーリンガーインゲルハイム社製)1.0gを、予めポリソルベート80を1.0%となるように加えた1,4-ジオキサン〔関東化学(株)製試薬〕に加えて溶解し100mlとした。このポリマー溶液を室温まで冷却後、7cm×10cm×1cmのゼラチン

スponジ（スponゼル）にポリマー溶液を吸収できなくなるまで滴下して湿潤させた（約70ml）。次にこのポリマー溶液を吸収したゼラチnスponジを-30℃で凍結後、0.1mba rで乾燥し複合多孔質体を得た。更にrhBMP-2（0.1mg/ml～0.8mg/ml；2.5%グリシン、0.5%白糖、5mM塩化ナトリウム、5mMグルタミン酸、0.01%ポリソルベート80；pH4.5）溶液約70mlを滴下して吸収させ、公知の方法で凍結乾燥し、本発明の多孔性骨移植体を得た。

### 実施例16

D. L-乳酸とグリコール酸との共重合体（モル比=75:25、分子量=50,000；ベーリンガーインゲルハイム社製）2.0gを、予めポリソルベート80を0.1重量%となるように加えた1,4-ジオキサン（関東化学（株）製試薬）に加えて溶解し100mlとした。このポリマー溶液を室温まで冷却後、7.5cm×10cm×0.3cmのコラーゲンスponジ（Helistat）（Marion Laboratories, Inc. 製）にポリマー溶液を吸収できなくなるまで滴下して湿潤させた。次にこのポリマー溶液を吸収したゼラチnスponジを-30℃で凍結後、0.1mba rで乾燥し複合多孔質体を得た。更にrhBMP-2（0.1mg/ml～0.8mg/ml；2.5%グリシン、0.5%白糖、5mM塩化ナトリウム、5mMグルタミン酸、0.01%ポリソルベート80；pH4.5）溶液約22.5mlを滴下して吸収させ、公知の方法で凍結乾燥し、本発明の多孔性骨移植体を得た。

### 実施例17

ヒアルロン酸ナトリウム（分子量=800,000；紀文フードケミカル）2.1gを注射用蒸留水300ml溶解した。別に、ゼラチn（G-785P及びG786P；新田ゼラチn製）9gを1N-酢酸水溶液300mlに溶解した。前記ヒアルロン酸溶液に前記ゼラチn溶液を加え、T. K. ホモ

ミキサーにより 9 0 0 0 r p m で 5 分間攪拌した。その時生じた泡を集め、- 8 0 ℃ のフリーザーで凍結した。凍結乾燥機で乾燥しスポンジを得た。

次にポリ D, L - 乳酸 (分子量 = 5 0, 0 0 0 ; 三井東圧化学 (株) 製) 1. 0 g を、ポリソルベート 8 0 の 0. 1 重量 % を含む 1, 4 - ジオキサン (関東化学 (株) 製試薬) に加えて溶解し 1 0 0 m l とした。このポリマー溶液を室温まで冷却後、3 c m × 3 c m × 1 c m の前記スポンジにポリマー溶液を吸收できなくなるまで滴下して湿潤させた。次にこのポリマー溶液を吸収したゼラチンスポンジを - 3 0 ℃ で凍結後、0. 1 m b a r で乾燥し複合多孔質体を得た。更に r h B M P - 2 (0. 1 m g / m l ~ 0. 8 m g / m l ; 2. 5 % グリシン, 0. 5 % 白糖, 5 mM 塩化ナトリウム, 5 mM グルタミン酸, 0. 0 1 % ポリソルベート 8 0 ; pH 4. 5) 溶液約 9 m l を滴下して吸収させ、公知の方法で凍結乾燥し、本発明の多孔性骨移植体を得た。

#### 実施例 1 8

D, L - 乳酸とグリコール酸との共重合体 (モル比 = 7 5 : 2 5, 分子量 = 5 0, 0 0 0 : ベーリンガーインゲルハイム社製) 2. 0 g を酢酸エチル (関東化学 (株) 製試薬) に加えて溶解し 1 0 0 m l とし、7 c m × 1 0 c m × 1 c m のゼラチンスポンジ (スポンゼル) を浸漬させた後、室温にて通風乾燥し複合多孔質体を得た。次にこれに r h B M P - 2 (0. 1 m g / m l ~ 0. 8 m g / m l ; 2. 5 % グリシン, 0. 5 % 白糖, 5 mM 塩化ナトリウム, 5 mM グルタミン酸, 0. 0 1 % ポリソルベート 8 0 ; pH 4. 5) 溶液約 7 0 m l を滴下して吸収させ、公知の方法で凍結乾燥し、本発明の多孔性骨移植体を得た。

#### 実施例 1 9

D, L - 乳酸とグリコール酸との共重合体 (モル比 = 7 5 : 2 5, 分子量 = 5 0, 0 0 0 : ベーリンガーインゲルハイム社製) 2. 0 g を酢酸エチル

〔関東化学（株）製試薬〕に加えて溶解し100mlとし、7.5cm×10cm×0.3cmのコラーゲンスポンジ（Helistat）（Marion Laboratories, Inc. 製）に浸漬させた後、室温にて減圧乾燥し複合多孔質体を得た。次にこれにrhBMP-2（0.1mg/ml～0.8mg/ml；2.5%グリシン、0.5%白糖、5mM塩化ナトリウム、5mMグルタミン酸、0.01%ポリソルベート80；pH4.5）溶液約22.5mlを滴下して吸収させ、公知の方法で凍結乾燥し、本発明の多孔性骨移植体を得た。

### 実施例20

D, L-乳酸とグリコール酸との共重合体（モル比=75:25, 分子量=50,000:ベーリンガーインゲルハイム社製）2.0gを酢酸エチル〔関東化学（株）製試薬〕に加えて溶解し100mlとし、7.5cm×10cm×0.3cmのコラーゲンスポンジ（Helistat）（Marion Laboratories, Inc. 製）に浸漬させた後、室温にて通風乾燥し複合多孔質体を得た。次にこれにrhBMP-2（0.1mg/ml～0.8mg/ml；2.5%グリシン、0.5%白糖、5mM塩化ナトリウム、5mMグルタミン酸、0.01%ポリソルベート80；pH4.5）溶液約22.5mlを滴下して吸収させ、公知の方法で凍結乾燥し、本発明の多孔性骨移植体を得た。

### 実施例21

ポリL-乳酸（分子量=60,000:ベーリンガーインゲルハイム社製）1.0gを、予めポリソルベート80の0.1重量%を含む1,4-ジオキサン〔関東化学（株）製試薬〕に加えて溶解し加えて溶解し100mlとした。このポリマー溶液を室温まで冷却後、7cm×10cm×1cmのゼラチンスポンジ（スポンゼル）にポリマー溶液を吸収できなくなるまで滴下して湿潤させた（約70ml）。次にこのポリマー溶液を吸収したゼラチンス

ポンジを-30℃で凍結後、0.1 mbarで乾燥した。次にポリソルベート80を1重量%とした水溶液を滴下して湿潤させた後、公知の方法により凍結乾燥し複合多孔質体を得た。更にrhBMP-2 [0.1 mg/ml ~ 0.8 mg/ml; 2.5%グリシン、0.5%白糖、5mM塩化ナトリウム、5mMグルタミン酸、0.01%ポリソルベート80; pH 4.5] 溶液約70mlを滴下して吸収させ、公知の方法で凍結乾燥し、本発明の多孔性骨移植体を得た。

### 実施例22

D, L-乳酸とグリコール酸との共重合体（モル比=50:50、分子量=40,000:ベーリンガーインゲルハイム社製）8.0gを予めポリソルベート80（関東化学（株）製試薬）を0.1重量%となるように加えた1,4-ジオキサン（関東化学（株）製試薬）に加えて加熱溶解し100mlとした。このポリマー溶液を室温まで冷却後、7cm×10cm×1cmのゼラチンスポンジ（スポンゼル）にポリマー溶液を吸収できなくなるまで滴下・湿潤させた（約7.0ml）。次にこのポリマー溶液を吸収したスポンゼルを-30℃で凍結し、0.1 mbarで凍結乾燥し複合多孔質体を得た。更にこれにrhBMP-2 [0.12 mg/ml ~ 5.9 mg/ml; 2.5%グリシン、0.5%白糖、5mM塩化ナトリウム、5mMグルタミン酸、0.01%ポリソルベート80; pH 4.5] 溶液約60mlを滴下・吸収させた後、公知の方法で凍結乾燥し、rhBMP-2 (0.1 mg/ml ~ 5.0 mg/ml)を含有する本発明の多孔性骨移植体を得た。

### 実施例23

D, L-乳酸とグリコール酸との共重合体（モル比=50:50、分子量=40,000:ベーリンガーインゲルハイム社製）8.0gを予めポリソルベート80（関東化学（株）製試薬）を0.1重量%となるように加えた1,4-ジオキサン（関東化学（株）製試薬）に加えて加熱溶解し100mlとした。

このポリマー溶液を室温まで冷却後、7 cm × 10 cm × 1 cmのゼラチンスポンジ（ポンゼル）にポリマー溶液を吸収できなくなるまで滴下・湿润させた（約70 ml）。次にこのポリマー溶液を吸収したポンゼルを-30℃で凍結し、0.1 mbarで凍結乾燥し複合多孔質体を得た。これを7 mm × 7 mm × 4 mmに切断後、rh BMP-2 [1.2 mg/ml ~ 5.9 mg/ml；2.5%グリシン、0.5%白糖、5 mM塩化ナトリウム、5 mMグルタミン酸、0.01%ポリソルベート80；pH 4.5] 溶液と血液を1:9に混和した溶液約170 μlを滴下して吸収させ、rh BMP-2 (0.1 mg/ml ~ 5.0 mg/ml) を含有する本発明の多孔性骨移植体を得た。

#### 実施例24

D、L-乳酸とグリコール酸との共重合体（モル比=50:50、分子量=40,000：ベーリンガーインゲルハイム社製）12.0 gを予めポリソルベート80（関東化学（株）製試薬）を0.5重量%となるように加えた1,4-ジオキサン（関東化学（株）製試薬）に加えて加熱溶解し150 mlとした。このポリマー溶液を室温まで冷却後、7 cm × 10 cm × 1 cmのゼラチンスポンジ（ポンゼル）を含浸する。次にこのポリマー溶液にポンゼルを浸漬したまま-45℃で凍結後、0.1 mbarで凍結乾燥した。周囲に付着したポリマーを剃刀で切除した後、135℃で36分間乾熱滅菌をした。こうして得られた複合多孔質体にrh BMP-2 [0.12 mg/ml ~ 5.9 mg/ml；2.5%グリシン、0.5%白糖、5 mM塩化ナトリウム、5 mMグルタミン酸、0.01%ポリソルベート80；pH 4.5] 溶液を約60 ml滴下して吸収させ、rh BMP-2 (0.1 mg/ml ~ 5.0 mg/ml) を含有する本発明の多孔性骨移植体を得た。

#### 実施例25

D、L-乳酸とグリコール酸との共重合体（モル比=50:50、分子量

= 4 0, 0 0 0 : ベーリンガーインゲルハイム社製) 1 2. 0 g を予めポリソルベート 8 0 (関東化学(株)製試薬) を 0. 5 重量% となるように加えた 1, 4 - ジオキサン(関東化学(株)製試薬)に加えて加熱溶解し 1 5 0 m l とした。このポリマー溶液を室温まで冷却後、7 c m × 1 0 c m × 1 c m のゼラチンスポンジ(スポンゼル)を含浸する。次にこのポリマー溶液にスポンゼルを浸漬したまま - 4 5 ℃ で凍結後、0. 1 m b a r で凍結乾燥した。周囲に付着したポリマーを剃刀で切除し、複合多孔質体を得た。更にこれに r h B M P - 2 (0. 1 2 m g / m l ~ 5. 9 m g / m l ; 2. 5 % グリシン, 0. 5 % 白糖, 5 mM 塩化ナトリウム, 5 mM グルタミン酸, 0. 0 1 % ポリソルベート 8 0 ; pH 4. 5) 溶液を約 6 0 m l 滴下して吸収させた後、公知の方法で凍結乾燥し、r h B M P - 2 (0. 1 m g / m l ~ 5. 0 m g / m l ) を含有する本発明の多孔性骨移植体を得た。

### 実施例 2 6

D, L - 乳酸とグリコール酸との共重合体(モル比 = 5 0 : 5 0、分子量 = 4 0, 0 0 0 : ベーリンガーインゲルハイム社製) 1 0. 0 g を予めポリソルベート 8 0 (関東化学(株)製試薬) を 0. 5 重量% となるように加えた 1, 4 - ジオキサン(関東化学(株)製試薬)に加えて加熱溶解し 1 0 0 m l とした。このポリマー溶液を室温まで冷却後、7 c m × 1 0 c m × 1 c m のゼラチンスポンジ(スポンゼル)にポリマー溶液が吸収できなくなるまで滴下・湿润させた(約 7 0 m l )。次にこれを - 3 0 ℃ で凍結後、0. 1 m b a r で凍結乾燥し複合多孔質体を得た。r h B M P - 2 (0. 1 2 m g / m l ~ 5. 9 m g / m l ; 2. 5 % グリシン, 0. 5 % 白糖, 5 mM 塩化ナトリウム, 5 mM グルタミン酸, 0. 0 1 % ポリソルベート 8 0 ; pH 4. 5) 溶液を約 6 0 m l 滴下して吸収させた後、公知の方法で凍結乾燥し、r h B M P - 2 (0. 1 m g / m l ~ 5. 0 m g / m l ) を含有する本発明の多孔性骨移植体を得た。

## 請 求 の 範 囲

1. 生体吸収性親水性材料からなる多孔性構造体の表面に生体吸収性高分子材料からなる表面層を有する複合多孔質体に、骨誘導因子を担持することを特徴とする骨形成用移植体。
2. 生体吸収性親水性材料が、ゼラチン、ヒアルロン酸、ヒアルロン酸誘導体、コラーゲン、コラーゲン誘導体、キトサン、キトサン誘導体、及びアルギン酸トリエタノールアミンからなる群から選択される1種または2種以上の化合物であり、生体吸収性高分子材料がポリ乳酸、ポリ乳酸ポリグリコール酸共重合体、及びポリ[ビス(p-カルボキシフェノキシ)プロパン]無水物とセバシン酸との共重合体からなる群から選択される1種または2種以上の化合物である請求の範囲1記載の骨形成用移植体。
3. 生体吸収性親水性材料が、ゼラチン、ゼラチン/ヒアルロン酸ポリイオン複合体、及びコラーゲン、からなる群から選択される1種または2種以上の化合物である請求の範囲2記載の骨形成用移植体。
4. 生体吸収性高分子材料が、平均分子量5000～1500000のポリ乳酸、及び平均分子量5000～1500000のポリ乳酸の含有率(モル比)が40%以上であるポリ乳酸ポリグリコール酸共重合体からなる群から選択される1種または2種以上の化合物である請求の範囲2又は3記載の骨形成用移植体。
5. 複合体孔質体の表面層に更に界面活性剤を添加したものである請求の範囲1記載の骨形成用移植体。
6. 複合多孔質体の平均孔径が10～1000μmで気孔率60%以上である

る請求の範囲 1 記載の骨形成用移植体。

7. 複合多孔質体の平均孔径が  $40 \sim 600 \mu m$  であり、気孔率が 80% 以上である請求の範囲 6 記載の骨形成用移植体。

8. 多孔性構造体が平均孔径  $50 \sim 500 \mu m$  で気孔率 90% 以上のゼラチンスponジである請求の範囲 3 又は 7 記載の骨形成用移植体。

9. ゼラチン、ヒアルロン酸、及びヒアルロン酸誘導体からなる群から選択される 1 種または 2 種以上の生体吸収性親水性材料からなる多孔性構造体の表面に、ポリ乳酸、ポリ乳酸ポリグリコール酸共重合体、及びポリ [ ビス (p-カルボキシフェノキシ) プロパン] 無水物とセバシン酸との共重合体からなる群から選択される 1 種または 2 種以上の生体吸収性高分子材料を付与してなる複合多孔質体。

10. 生体吸収性親水性材料が、ゼラチン、及びゼラチン/ヒアルロン酸ポリイオン複合体からなる群から選択される 1 種または 2 種以上の化合物である請求の範囲 9 記載の複合体孔質体。

11. 生体吸収性高分子材料が、平均分子量  $5000 \sim 1500000$  のポリ乳酸、及び平均分子量  $5000 \sim 1500000$  のポリ乳酸の含有率 (モル比) が 40% 以上であるポリ乳酸ポリグリコール酸共重合体からなる群から選択される 1 種または 2 種以上の化合物である請求の範囲 9 又は 10 記載の複合体孔質体。

12. 多孔性構造体が平均孔径  $50 \sim 500 \mu m$  で気孔率 90% 以上のゼラチンスponジである請求の範囲 11 記載の複合多孔質体。

13. 複合多孔質体の表面層に更に界面活性剤を添加したものである請求の範囲9記載の多孔性複合体。

図 1

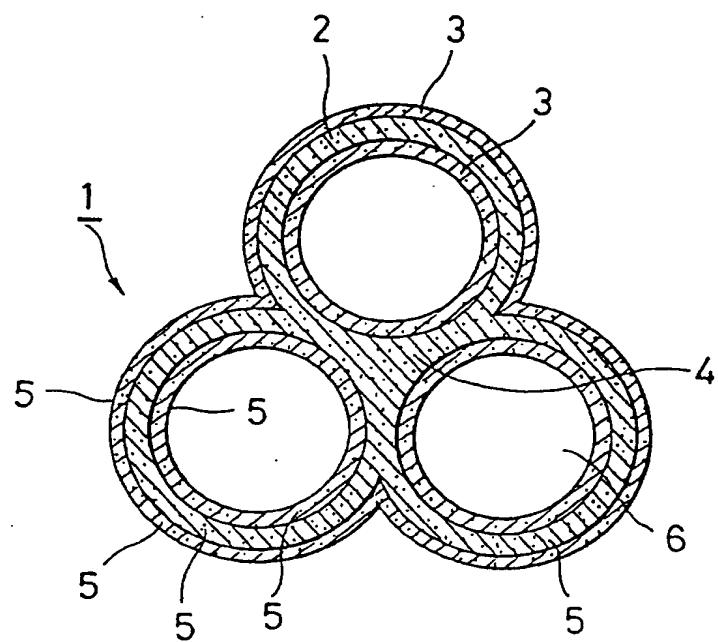


図 2

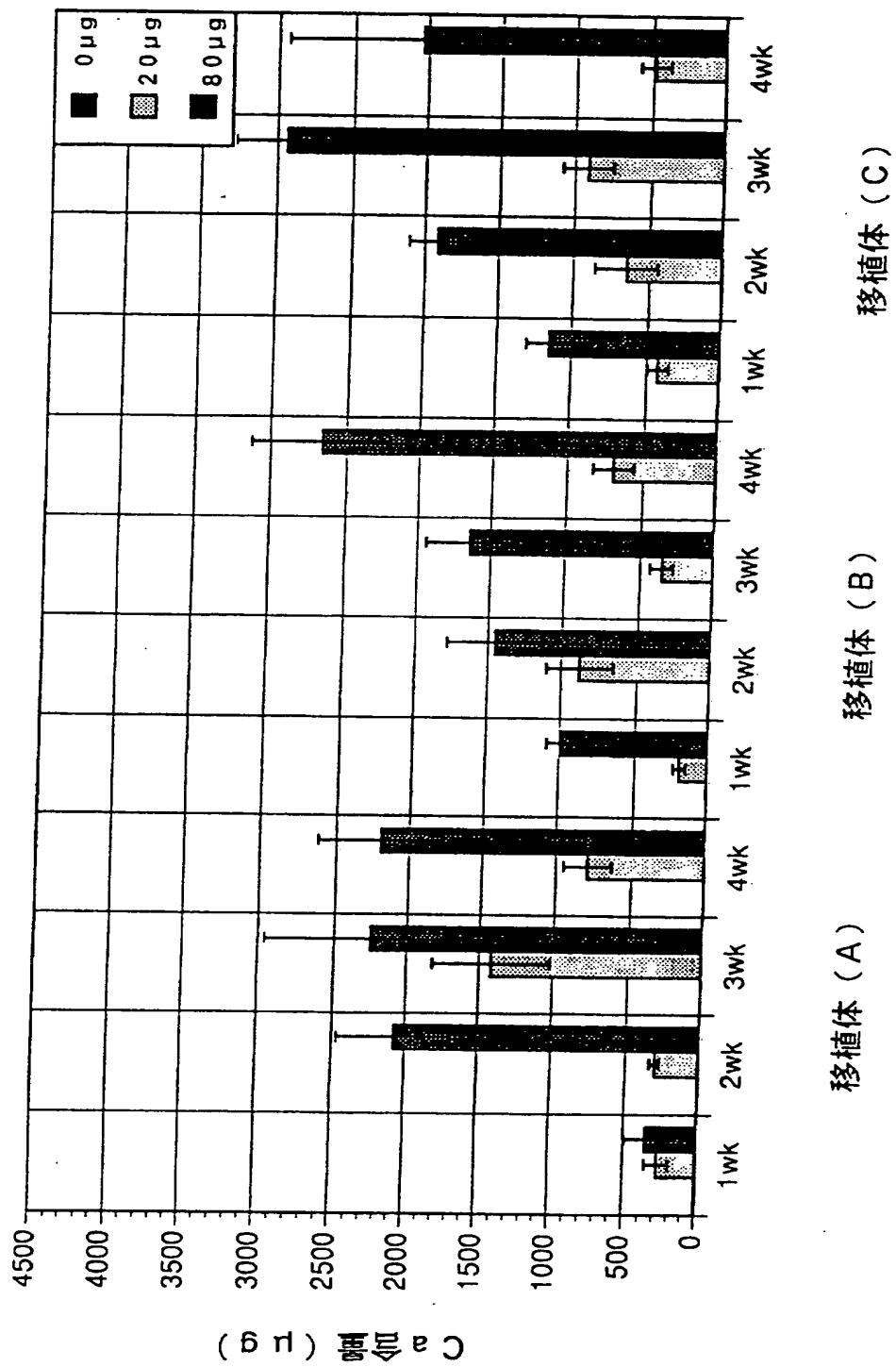


図 3

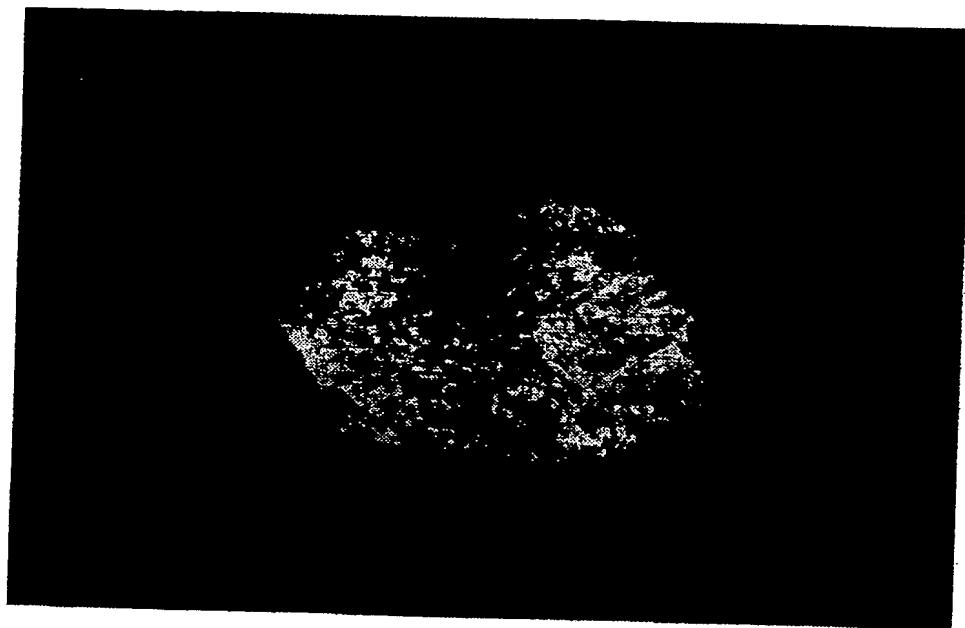


図 4



図 5



図 6

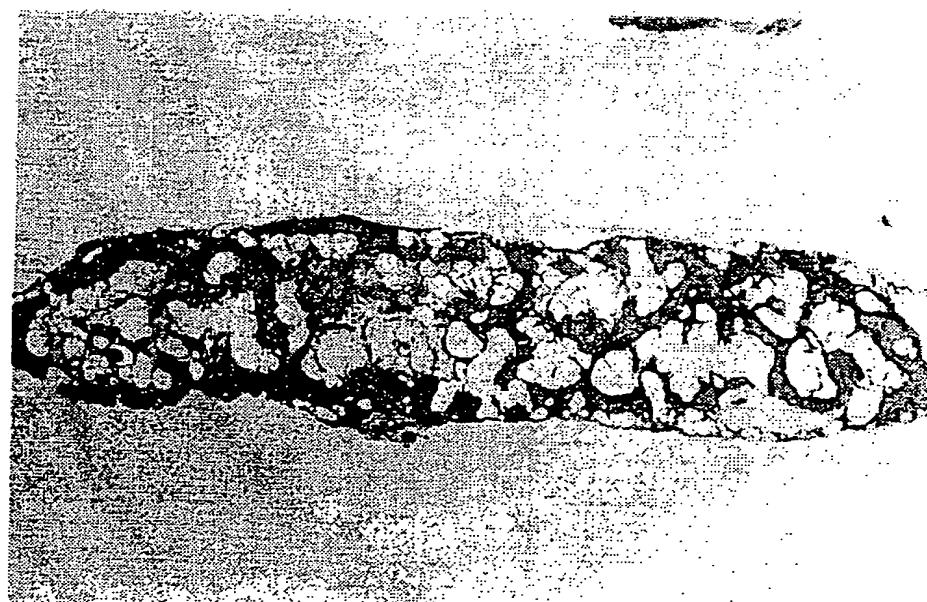


図 7

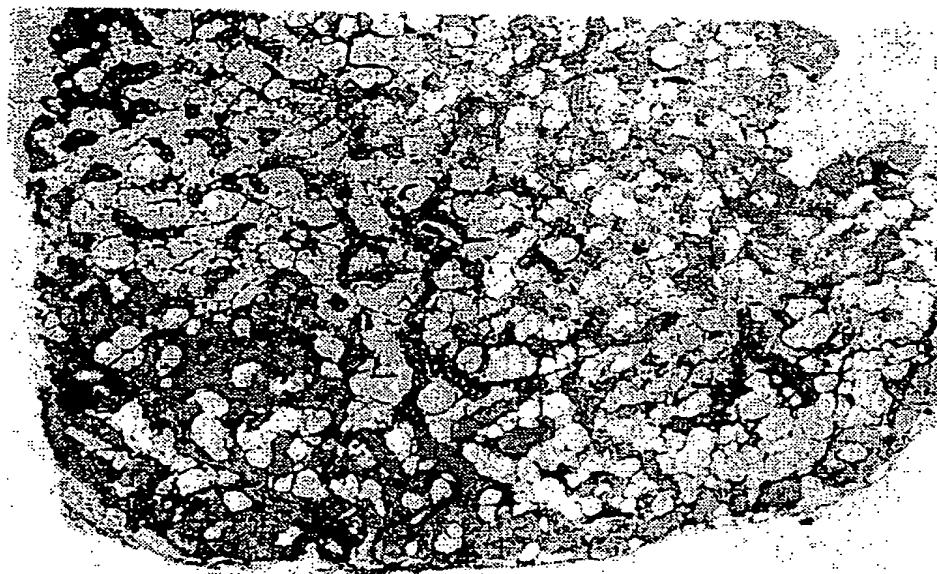
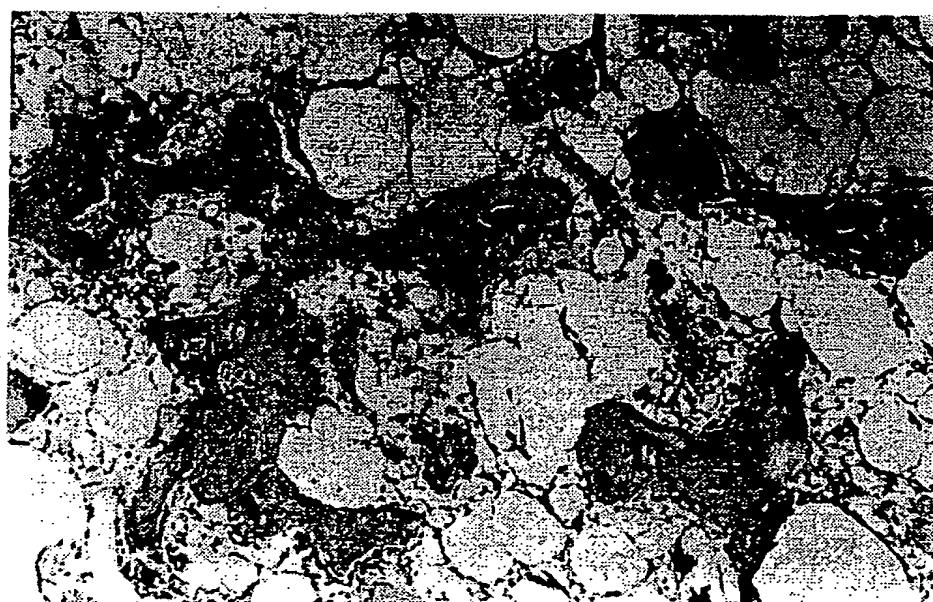
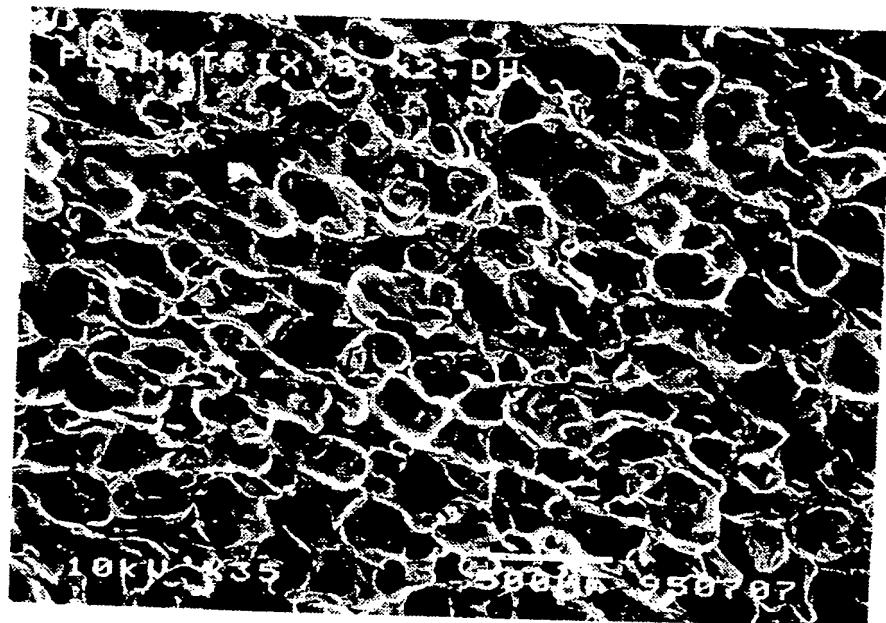


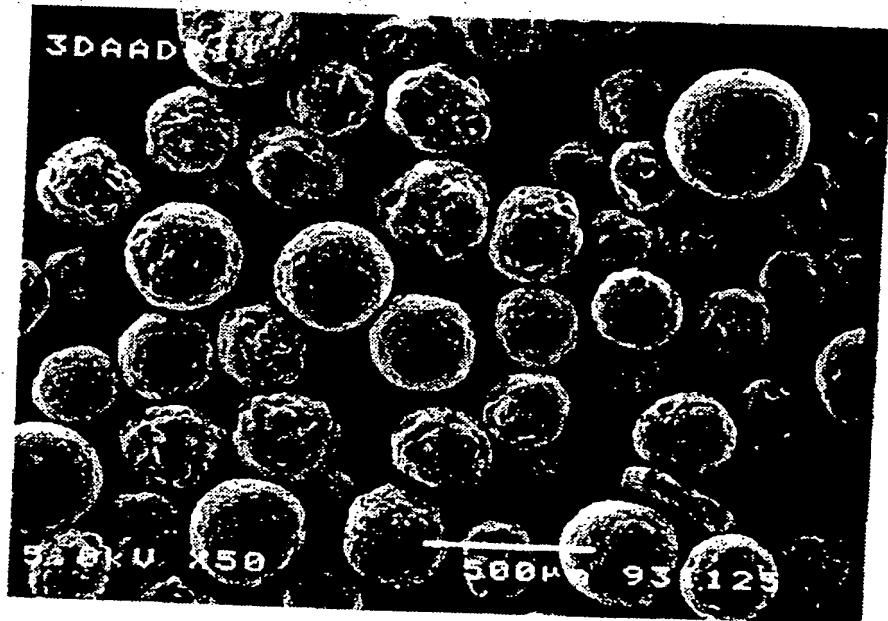
図 8



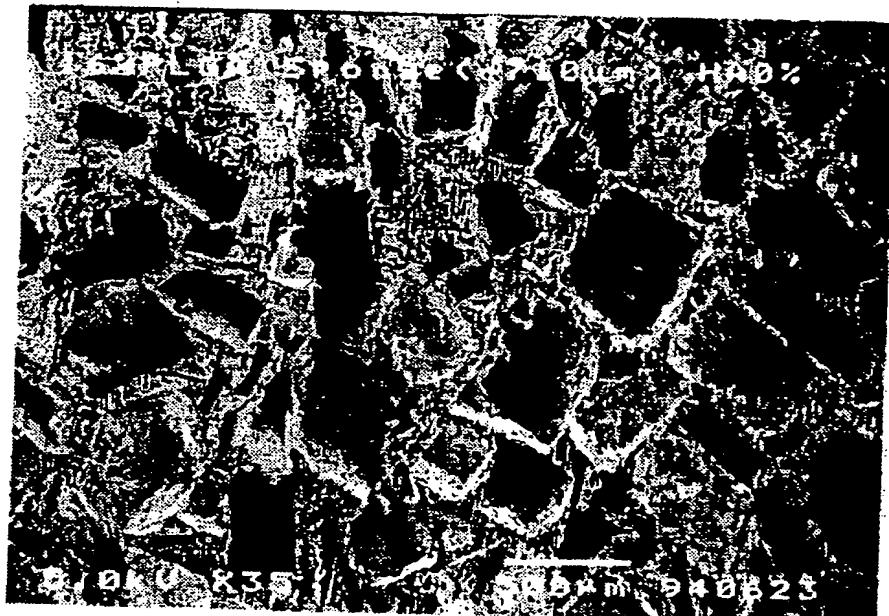
■ 9



■ 10



11



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP95/01970

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
Int. Cl<sup>6</sup> A61L27/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> A61L27/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X         | JP, 1-232967, A (Osmed Inc.), September 18, 1989 (18. 09. 89) (Family: none)                      | 9 - 13                |
| Y         |   | 1 - 8                 |
| X         | JP, 3-23864, A (Gunze Ltd.), January 31, 1991 (31. 01. 91) (Family: none)                         | 9 - 13                |
| Y         |   | 1 - 8                 |
| Y         | JP, 60-253455, A (Kyocera Corp. and another), December 14, 1985 (14. 12. 85) (Family: none)       | 1 - 13                |
| Y         | JP, 61-33660, A (Klaus Draenert), February 17, 1986 (17. 02. 86) & EP, 159036, A & US, 4713076, A | 1 - 13                |
| Y         | JP, 63-238867, A (Ibiden Co., Ltd.), October 4, 1988 (04. 10. 88) (Family: none)                  | 1 - 13                |
| Y         | JP, 63-272355, A (Stichting Science Park Groning), November 9, 1988 (09. 11. 88) & EP, 277678, A  | 1 - 13                |

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

- Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

|  |  |
|--|--|
| Date of the actual completion of the international search<br>November 8, 1995 (08. 11. 95) | Date of mailing of the international search report<br>November 28, 1995 (28. 11. 95) |
| Name and mailing address of the ISA/<br>Japanese Patent Office<br>Facsimile No.            | Authorized officer<br>Telephone No.  |

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. CL<sup>8</sup> A61L27/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. CL<sup>8</sup> A61L27/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|----------------|--|------------------|
| X<br>Y         | JP, 1-232967, A(オスメッド インコーポレイテッド)<br>18. 9月. 1989 (18. 09. 89) (ファミリーなし) | 9-13<br>1-8      |
| X<br>Y         | JP, 3-23864, A(グンゼ株式会社)<br>31. 1月. 1991 (31. 01. 91) (ファミリーなし)           | 9-13<br>1-8      |
| Y              | JP, 60-253455, A(京セラ株式会社 外1名)<br>14. 12月. 1985 (14. 12. 85) (ファミリーなし)    | 1-13             |

 C欄の続きをにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「I」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日  
 若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献  
 (理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の  
 の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と  
 矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため  
 に引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規  
 性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文  
 献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性  
 がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

08. 11. 95

## 国際調査報告の発送日

28.11.95

## 名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
 郵便番号100  
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

## 特許庁審査官(権限のある職員)

佐野 整博

4 C 7 0 1 9

④

電話番号 03-3581-1101 内線

3452

## C(続き) 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| Y               | JP, 61-33660, A(クラウス・ドレナー),<br>17. 2月. 1986(17. 02. 86)<br>&EP, 159036, A&US, 4713076, A       | 1-13             |
| Y               | JP, 63-238867, A(イビデン株式会社),<br>4. 10月. 1988(04. 10. 88)(ファミリーなし)                               | 1-13             |
| Y               | JP, 63-272355, A(ステイクティング サイエンス パー<br>ク グローリング),<br>9. 11月. 1988(09. 11. 88)<br>&EP, 277678, A | 1-13             |